



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

Estudio clínico, anatomopatológico y de biología molecular de cuadros
entéricos en cerdos de crecimiento y terminación

Autor: Méd. Vet. PÉREZ, Estefanía Marisol

Director: Dr. CAPUCCIO, Javier Alejandro

Director: Dra. QUIROGA, María Alejandra

Codirectora: Dra. MOREDO, Fabiana Alicia

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Patología Especial Veterinaria

“Dr. Bernardo Epstein”

Miembros del jurado:

Dr. SARRADEL, Javier

Dr. ZIELINSKI, Gustavo

Dr. LEOTTA, Gerardo Aníbal

AÑO 2016

a). Dedicatoria

Le dedico mi tesis doctoral a mi abuela Porota, por haber sido un pilar fundamental en mi educación y transferirme los valores más importantes de mi vida. También a mi nona Nella, por acompañarme siempre con alegría, sabiduría y amor.

A ellas, dos mujeres que marcaron mi vida.

b). Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi querido país, que me permitió estudiar toda mi vida de forma gratuita y que durante esta etapa de posgrado, a través de becas del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación y del CONICET, financió mis estudios. También al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, la Facultad de Ciencias Veterinarias y la Universidad Nacional de La Plata, que fueron los instrumentos para que todo esto sea posible.

En el plano personal, agradezco infinitamente a mis padres, a mi mamá, por su amor, su confianza ciega en mí y sus ejemplos continuos de responsabilidad. A mi papá, por creer tanto en mí, apoyarme y alentarme como nadie. A mis hermanos y mi primo Guille, porque con ellos compartí mi vida de estudiante y gran parte del doctorado. Gracias por sus momentos, por escucharme y acompañarme. A mis nona, tíos y primos... A mi familia en general. A mis amigos, por hacer mi vida más divertida. Por todos estos años llenos de momentos geniales. A la familia Zubia, por la ayuda de estos últimos años. A la familia Riegler, por integrarme con amor y dejarme ser parte de ellos. Por cuidar de mí como lo haría mi propia familia. A Luciano, el amor de mi vida... Muchas gracias por tu apoyo y tus palabras, siempre justas y precisas.

En el ámbito académico, agradezco en primer lugar al Dr. Carlos Perfumo, un maestro increíble, que me alentó y enseñó desde el primer día con una humildad admirable. A la Dra. María Alejandra Quiroga, por mostrarme con ejemplos que la responsabilidad y el compromiso son fundamentales. Al Dr. Javier Cappuccio, por instruirme en el razonamiento crítico y científico y por haberme enseñado siempre. A la Dra. Fabiana Moredo por ser mi "guía molecular" y a la Dra. Mariana Machuca, por estar siempre. A mi gran amigo, el Med. Vet. Ramiro Rearte, por su colaboración con el análisis estadístico. A la veterinaria Flavia

Chávez y a mi amiga Candelaria Zubia, por su colaboración en el trabajo de laboratorio y campo. Agradezco a Quique, Carolina, Lorena, Iris y Fabio, y en especial a Oscar y Walter, por su gran ayuda en las tareas cotidianas. A la Dra. Adriana Massone, por ayudarme en este proceso, y a mis compañeros del Laboratorio, en especial a Nico, Gonza Inés y Hernán, por emprender este camino juntos, ayudándonos mutuamente. Agradezco también al Dr. Germán Vigo y a la Med. Vet. Mariela Ibar por colaborar en los estudios bacteriológicos y al Dr. Gastón Moré por sus sugerencias en el área molecular. A la Med. Vet. Laura Alarcón, por enseñarme y ayudarme en la etapa de campo. A la Dra. Sara Williams por iniciarme y mostrarme la producción porcina.

Por último agradezco a los colegas, propietarios y operarios de las granjas evaluadas, por su colaboración con la investigación llevada a cabo en la Universidad Pública. Ojalá estos resultados se puedan volcar a la sociedad a través de los veterinarios, cumpliendo así, el principal objetivo de este estudio y de las entidades estatales.

!!!!Eternamente gracias!!!!

c). Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis:

Trabajos presentados en congresos:

-Quiroga MA; Cappuccio JA; Madariaga J; Machuca MA; Barrales H; Lozada MI; **Pérez E**; Perfumo CJ. Ganglioneuromatosis en íleon de un lechón. Estudios anatomopatológicos e inmunoquímicos. VIII RAPAVE (Reunión Argentina de Patología Veterinaria). Facultad de C. Veterinarias, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, mayo de 2012.

-**Pérez E**; Lozada MI; Cappuccio JA; Machuca MA; Barrales H; Quiroga MA; Perfumo CJ. Estudio retrospectivo de la casuística de cuadros entéricos en cerdos de desarrollo-terminación remitidos al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria. XI Congreso Nacional de Producción Porcina, XVII Jornadas de Actualización Porcina y VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur, Salta, agosto de 2012. Seleccionado para presentación en forma oral.

-**Pérez E**; Zubia C; Alarcón L; Barrales H; Lozada MI; Quiroga MA; Moredo F; Machuca M; Cappuccio JA; Perfumo JC. Fecal detection of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* by PCR. Cross sectional study in four farms. 23rd International Pig Veterinary Society Congress, Cancún, México. Seleccionado para presentación oral.

-Alarcón L; Streitenberger N; **Pérez E**; Galván W; Fazzio L; Cappuccio JA; Mateu E. *Ascaris suum* and other parasites in intensive farming production in Argentina. 23rd International Pig Veterinary Society Congress, Cancún, México. Selected for oral presentation in Cancun, Mexico.

-**Pérez E**; Zubia C; Chávez F; Alarcón L; Barrales H; Lozada MI; Quiroga MA; Moredo F; Machuca M; Cappuccio JA; Perfumo CJ. Detección de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* y *Brachyspira pilosicoli* en materia fecal mediante PCR multiplex. Estudio transversal en 6 granjas intensivas. XII Congreso Nacional de Producción Porcina, XVIII Jornadas de Actualización Porcina y VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur. Mar

del Plata, agosto 2014. En función de sus aportes al conocimiento, este trabajo recibió el Primer Premio en el Área Sanidad.

-Chávez F; **Pérez E**; Barrales H; Zignago F; Lozada MI; Quiroga MA; Machuca M; Cappuccio JA; Perfumo JC. Análisis de los cuadros entéricos en cerdos remitidos al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria (año 2013). XII Congreso Nacional de Producción Porcina, XVIII Jornadas de Actualización Porcina y VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur. Mar del Plata, agosto 2014.

-**Pérez E**; Zubia C; Chávez F; Barrales H; Lozada MI; Quiroga MA; Machuca M; Cappuccio JA; Perfumo JC. Evaluación histopatológica de lesiones intestinales en cuadros entéricos en cerdos de desarrollo y terminación. XI Reunión de Patología Veterinaria 2014. Tandil, octubre de 2014.

-**Pérez E**; Cappuccio JA; Rearte R; Machucca M; Ibar M; Alarcón L; Lozada MI; Barrales H; Perfumo JC. Detection of bacterial enteric pathogens in fattener pigs. A cross-sectional study in eight farrow-to-finish herds in Argentina. 24rd International Pig Veterinary Society Congress, Irlanda, 2016.

-**Pérez E**; Cappuccio JA; Quiroga MA; Moredo F; Rearte R; Perfumo JC. Correlation between detection of enteropathogenic bacteria and health and productive parameters in finishing pigs in Argentina. 24rd International Pig Veterinary Society Congress, Irlanda 2016.

-**Pérez E**; Carpinetti B; Grant J; Quiroga MA; Cappuccio JA; Perfumo CJ; Machuca M. Infección por *Lawsonia intracellularis* en cerdos silvestres de la Bahía Samborombón. Un estudio serológico. XIII Congreso Nacional de Producción Porcina, XIX Jornadas De Actualización Porcina. VIII Congreso De Producción Porcina Del Mercosur y Más Productores Más Producción. Resistencia, agosto de 2016.

-**Pérez E**; Barrales H; Lozada MA; Ibar M; Alarcon L; Rearte R; Quiroga MA; Moredo F; Machuca M, Cappuccio JA; Perfumo JC. Efecto de los agentes enteropatógenos en los parámetros sanitarios y productivos de cerdos de recría y engorde. XIII Congreso Nacional de Producción Porcina, XIX Jornadas De Actualización Porcina. VIII Congreso De

Producción Porcina Del Mercosur y Más Productores Más Producción. Resistencia, agosto de 2016. En función de sus aportes al conocimiento, este trabajo recibió el Primer Premio en el Área Sanidad.

Trabajos publicados:

-Quiroga MA; Lozada MI; Madariaga G; Cappuccio JA; Machuca M; Barrales H; **Pérez E**; Perfumo JC. Ileal Ganglioneuromatosis in a Piglet: Histopathological and Immunohistochemical Studies. *Journal of Comparative Pathology*. ELSEVIER SCI LTD, 2014. Vol. 151, n ° 4, p. 380-383.

-**Pérez E**; Lozada MI; Mcauliffe S; Pallarols NB; Camio G; Machuca M. Faecal shedding and serological study of *Lawsonia intracellularis* in horses in Argentina. 10th IEIDC. Abstracts Journal of Equine Veterinary Science, 2015. Vol. 39. S23-S25.

d) Abreviaturas y símbolos.

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA
Adenomatosis intestinal	AI
Circovirus porcino tipo 2	PCV-2
Cloruro de magnesio	MgCl ²
Conversión alimenticia	CA
Centímetros	cm
Dinucleótidostrifosfatos	dNTPs
Disentería porcina	DP
Dólar	U\$S
Enfermedades transmitidas por alimentos	ETA
Enteritis necrótica	EN
Enteropatía proliferativa hemorrágica	EPH
Enteropatía proliferativa porcina	EPP
Espiroquetosis intestinal porcina	EIP
Estados Unidos de América	EE.UU.
Euro	€
Facultad de Ciencias Veterinarias	FCV
Grado centígrado	°C
Ganancia diaria de peso	GDP
Hibridación <i>in situ</i>	HIS
Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	ELISA
Ileítis regional	IR
Inmunohistoquímica	IHQ
Intervalo de confianza	IC
Kilogramo	kg
Libra esterlina	£
Mayor	>
Menor	<
Microgramo	mg
Microlitro	µl
Mililitro	ml
Milimol	mmol
Molar	M
Nanómetro	nm
Negativo	-
Odds ratio	OR
Organización Mundial de la Salud	OMS
Pares de bases	pb
Porcentaje	%
Positivo	+
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR

Revoluciones por minuto	rpm
spp.	especies
Tejido embebido en parafina	TEP
Tris-Ácido Acético-EDTA	TAE
Unidades internacionales	UI
Ultravioleta	UV
Universidad Nacional de la Plata	UNLP
Voltio	V
Warthin Starry	WS

e). Contenido	
Resumen	5
Keywords.....	7
1 Introducción.....	9
i. Consideraciones generales	9
ii. Enteropatía proliferativa porcina	10
iii. Enfermedades producidas por espiroquetas.....	14
iv. Salmonelosis porcina.....	18
v. Infecciones mixtas	21
vi. Aspectos generales del diagnóstico.....	21
vii. Prevalencia de enteropatía proliferativa porcina, disentería porcina, salmonelosis porcina y espiroquetosis intestinal porcina en Argentina y el mundo.....	24
viii. Impacto productivo y económico	27
2. Objetivos e hipótesis.....	30
i. Objetivo general	30
ii. Objetivos específicos.....	30
iii. Hipótesis más relevantes.....	30
3. Capítulo 1: Estudio retrospectivo de casos entéricos remitidos para histopatología.....	32
i. Materiales y métodos.....	32
a. Métodos tradicionales.....	32
b. Métodos moleculares a partir de tacos de parafina.....	35
c. Análisis estadístico	37
ii. Resultados	39
a. Selección de casos.....	39
b. Estudio histopatológico.....	39

c.	Lesiones orientativas para realizar una asociación etiológica	40
d.	Estudio histoquímico, inmunohistoquímico y PCR	43
e.	Diagnóstico etiológico	44
iii.	Discusión	49
iv.	Conclusiones	57
4.	Capítulo 2: Estudio prospectivo en 8 granjas de cerdos	59
i.	Materiales y métodos	59
a.	Selección de las granjas	59
b.	Obtención de los datos	60
c.	Evaluación clínica	60
d.	Diseño experimental	60
e.	Necropsias y obtención de muestras de animales hallados muertos	61
f.	Estudios moleculares	62
g.	Estudios bacteriológicos	65
h.	Definición de cuadro clínico y subclínico:	65
i.	Análisis de los resultados	66
ii.	Resultados	68
a.	Características de los establecimientos	68
b.	Frecuencia de animales positivos a los agentes en estudio y porcentajes de detección global por granja	69
c.	Frecuencia de animales positivos a los patógenos en estudio según granja, edad y ocurrencia de diarrea	69
a.	Frecuencia de animales positivos según el grado de la materia fecal	71
b.	Análisis estadístico a nivel individual	76
iii.	Discusión	81

a.	Frecuencia de animales positivos a los agentes en estudio.....	81
b.	Frecuencia de detección por granja.....	84
c.	Detecciones por edad.....	87
d.	Presencia de diarrea.....	89
e.	Necropsias	93
f.	Infecciones mixtas en animales vivos y muertos.....	93
iv.	Conclusiones	95
5.	Capítulo 3: Efecto de la presencia de enteropatógenos sobre los parámetros productivos y estimación del costo de EPP y DP	97
i.	Materiales y métodos.....	97
a.	Efecto de la presencia de enteropatógenos sobre los parámetros productivos y sanitarios: evaluación a nivel granja	97
b.	Análisis de los costos directos de enteropatía proliferativa porcina y disentería porcina.....	98
ii.	Resultados	101
a.	Efecto de la presencia de enteropatógenos sobre los parámetros productivos: evaluación a nivel granja	101
b.	Análisis de los costos directos de enteropatía proliferativa porcina y disentería porcina.....	101
v.	Discusión:.....	106
a.	Impacto productivo	106
b.	Pérdida económica asociada a enteropatía porcina y disentería porcina.....	109
iii.	Conclusiones	111
6.	Conclusiones generales.....	112
7.	Anexo	114

8. Bibliografía 117

Estudio clínico, anatomopatológico y de biología molecular de cuadros entéricos en cerdos de crecimiento y terminación.

Palabras claves

Enteropatógenos, diarrea, cerdos, crecimiento y terminación.

Resumen

Se evaluó la participación de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella* spp. en el desarrollo de infecciones clínicas y subclínicas en cerdos de la etapa de engorde. Se realizó un estudio retrospectivo histopatológico de casos de archivo en el que se relacionaron las lesiones histopatológicas con los agentes etiológicos identificados por IHQ, WS y PCR a partir de tejidos embebidos en parafina. Se detectó asociación estadística entre las lesiones histopatológicas, en particular la hiperplasia de los enterocitos inmaduros de la cripta, la necrosis profunda de la mucosa y la hiperplasia de las células caliciformes, y la detección de *L. intracellularis*, *Salmonella* spp. y *Brachyspira* spp., respectivamente. *Lawsonia intracellularis* resultó el agente más frecuentemente identificado en animales con y sin diarrea y su presentación subclínica fue muy frecuente a nivel individual, de lotes y de granjas. Se detectó *B. hyodysenteriae* en 2/8 granjas en cerdos con diarrea y su presencia se asoció con mal desempeño productivo, bajos niveles de bioseguridad y elevada mortalidad. *Salmonella* spp. se detectó en 5/8 granjas en animales con y sin diarrea. La detección de *L. intracellularis* y *Salmonella* aumentó con la edad de los cerdos, lo que implica una mayor chance de enteropatía proliferativa hemorrágica y mayor riesgo potencial de contaminación de la carne durante la faena, respectivamente. Se determinó que la presencia de *L. intracellularis* y *B. hyodysenteriae* impactan negativamente en la economía de las granjas,

asociado a la pérdida de peso y al gasto en antibióticos. *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, y *Salmonella* spp. son agentes frecuentes en la etapa de crecimiento y terminación, tanto en casos de archivos como en las granjas evaluadas, y tienen una participación relevante en el desarrollo de cuadros clínicos y subclínicos.

Clinical, anatomopathological and molecular studies of enteric diseases in grower-finisher pigs.

Keywords

Swine, enteropathogens, diarrhea, grower- finisher herds

Resumen

The role of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Salmonella* spp. in clinical and subclinical infection in grower and finisher pigs were evaluated. First, histopathological retrospective study was carried out in order to analyze the relationship between microscopic lesions and identification of those agents by immunohistochemistry, Warthin- Starry or PCR. Statistical association among crypt hyperplasia, necrosis the mucosa and hyperplasia of goblet cells, and detection of *L. intracellularis*, *Salmonella* spp., and *Brachyspira* spp. respectively, was observed. *Lawsonia intracellularis* was the most frequent agent detected in animals with and without diarrhea and their subclinical presentation was observed at individual, group and farm level. *Brachyspira hyodysenteriae* was detected in 2/8 farms, only in pigs with diarrhea. Poor productive performance, low biosecurity levels and high mortality rates were reported in positive farms. *Salmonella* spp. was detected in 5/8 farms in animals with and without diarrhea. Detection of *L. intracellularis* and *Salmonella* were higher in fattener than growing pigs. These findings increase the chance of hemorrhagic proliferative enteropathy by *L. intracellularis* and the potential risk of pork contamination at slaughter by *Salmonella*. Detection of *L. intracellularis* and *B. hyodysenteriae* was associated with lower average daily gain and higher costs for the use of antibiotics.

In conclusion, *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae*, and *Salmonella* spp. were identify in grower and finisher pig. Both, histopathology and molecular tools were useful for the detection of clinical and subclinical infection.

1 Introducción

i. Consideraciones generales

Las infecciones intestinales son comunes en cerdos de crecimiento y terminación de todo el mundo y causan importantes pérdidas económicas en la producción porcina (Stege y col., 2000; Thomson y Friendship, 2012). Una de las primeras enfermedades entéricas descrita en cerdos fue la salmonelosis (Salmon y Smith, 1886); luego se sumaron la identificación y caracterización de otros agentes infecciosos y causas no infecciosas. La diarrea es la manifestación clínica más frecuente de las enfermedades entéricas y se define como la presencia de agua en relativo exceso en proporción a la materia seca en las heces. La pérdida de solutos (principalmente sodio y potasio) y agua concomitante, puede conducir a una grave disminución de electrolitos, desequilibrio ácido-base y deshidratación (Uzal y col., 2016; Burrough, 2016). Las enfermedades entéricas muestran un espectro de signos clínicos, que van desde heces blandas durante pocos días, en un animal que se encuentra aparentemente sano, hasta heces netamente acuosas con o sin sangre, deshidratación grave y rápida pérdida de la condición corporal. En algunos casos puede ocurrir la muerte sin ningún signo clínico previo o el animal puede presentar un estado general inalterado o encontrarse severamente deprimido (Jacobson, 2003).

Las principales entidades entéricas que afectan a los cerdos en esta etapa incluyen: enteropatía proliferativa porcina (EPP) causada por *Lawsonia intracellularis* (McOrist y col., 1993; Lawson y col., 1993; McOrist y col., 1995), disentería porcina (DP) causada por *Brachyspira hyodysenteriae* (Taylor y Alexander, 1971; Ochail y col., 1997), espiroquetosis intestinal porcina (EIP) causada por *Brachyspira pilosicoli* (Taylor y col., 1980; Trott y col., 1996) y salmonelosis porcina (SP) causada por *Salmonella enterica* (Reed y col., 1986). Con menor frecuencia, otros agentes asociados a la presencia de diarrea en la etapa de engorde

son: *Escherichia coli* enteropatógena (Guerrant y col., 1985), circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) (Allan y col., 1998) y *Trichuris suis* (Battle y col., 1977). En los sistemas de producción intensiva, se considera que las enfermedades entéricas son responsables de aproximadamente el 30 % de las pérdidas económicas (Burch y col., 2000) y resultan una causa importante de mortalidad en nuestro país (Ross y col., 2000). Dichas pérdidas se asocian a incrementos de la tasas de morbimortalidad, reducción de la ganancia diaria de peso (GDP), aumento de la conversión alimenticia (CA), mayor cantidad de días para alcanzar el peso de faena y aumento en los gastos de antibióticos y vacunas (McOrist y col., 2006; Barcellos y col., 2010). A menudo, la diarrea en cerdos de engorde no puede ser atribuida a una sola causa, por lo que el enfoque diagnóstico, desde hace unos años, es de tipo poblacional y orientado a múltiples agentes. Al centrarse el diagnóstico en una población, el beneficio en el tratamiento es mayor y se maximiza la inversión en técnicas diagnósticas (Duhamel y Mathiesen, 1999). Por lo tanto, la rapidez y la sensibilidad diagnóstica son condiciones necesarias para instaurar tratamientos eficaces y dar soporte a los programas de prevención (Nathues y col., 2007).

ii. Enteropatía proliferativa porcina

La EPP es causada por *L. intracellularis*, una bacteria intracelular obligada, microaerófila, no esporulada, con un flagelo unipolar, que se caracteriza por producir engrosamiento de la mucosa de la última porción del íleon y, en menor grado, en ciego y la región proximal del colon, asociado a la proliferación del enterocito inmaduro de la cripta (Lawson y Gebhart, 2000; Vanucci y Gebhart, 2014).

La infección por *L. intracellularis*, puede desencadenar un cuadro clínico o, más frecuentemente, subclínico (Brandt y col., 2010).

Existen dos formas de presentación clínica:

- Forma aguda: llamada enteropatía proliferativa y hemorrágica (EPH), que afecta con más frecuencia a adultos jóvenes de entre 4 y 12 meses, como capones próximos a la edad de mercado y cerdas de reposición (Guedes, 2004; McOrist y Gebhart, 2012). Es de aparición súbita, pudiendo observarse palidez, fiebre e incluso abortos en hembras de reemplazo (Mauch y Bikei, 2005). Se presenta diarrea de aspecto rojizo oscuro a negruzco. El segmento intestinal afectado, se observa engrosado, con edema del meso y presencia de contenido sanguinolento, fibrina, coágulos de sangre y restos alimenticios en la luz intestinal (McOrist y Gebhart, 2006). El estudio histopatológico, evidencia congestión y hemorragia en la mucosa, asociados a la proliferación de los enterocitos de la cripta, la pérdida de células caliciformes y un moderado número de células inflamatorias en la lámina propia (Lawson y Gebhart, 2000; McOrist y Gebhart, 2012). Esta presentación es más común en granjas de alta sanidad (Winkelman y Dee, 1996) y se asocia con animales que no han sido previamente expuestos a las bacteria (Jacobson y col., 2010).
- Forma crónica: afecta a cerdos en crecimiento de entre 18 y 55 kg (8 a 16 semanas de vida) y puede manifestarse bajo tres presentaciones anatomopatológicas denominadas adenomatosis intestinal (AI), enteritis necrótica (EN) e ileítis regional (IR) (Lawson y Gebhart, 2000; McOrist y Gebhart, 2006). Todas las formas se caracterizan por el engrosamiento de la mucosa asociado a repliegues de la mucosa, la cual en casos leves puede ser focal y en casos avanzados difuso (McOrist y Gebhart, 2012). Los animales presentan edema del mesenterio y de la submucosa, que sumado a la hiperplasia del epitelio dan el aspecto cerebroide de la mucosa y el reticulado a la superficie serosa (Uzal y col., 2016). En la EN, sobre la mucosa engrosada se puede observar un exudado fibrinonecrótico firmemente

adherido y una marcada rigidez del intestino. En la IR, persiste el engrosamiento de la mucosa pero, a diferencia de las otras presentaciones, se hace muy evidente el aumento de espesor de la capa muscular e inclusive de la serosa (Uzal y col., 2016).

Las lesiones microscópicas en los estadios iniciales se caracterizan por la proliferación de células epiteliales inmaduras de las criptas, con disminución en el número de células caliciformes. La hiperplasia de enterocitos inmaduros es el reflejo de una inhibición específica de *L. intracellularis* en el proceso de diferenciación celular (Lawson y Gebhart, 2012). En los estadios de recuperación, se puede observar hiperplasia de células caliciformes, atrofia de las vellosidades e infiltrado mononuclear en lámina propia y submucosa. La restauración de la mucosa ocurre por re-epitelización y división de las células de la cripta con predominio de células caliciformes (Jensen y col., 1997).

Debido a que existe una única cepa de *L. intracellularis*, se cree que las diferentes expresiones clínicas de EPP en los cerdos son el resultado de la dosis infectante, el uso de antibióticos y la respuesta específica del huésped (Vanucci y Gebart, 2014). En la presentación subclínica, el animal infectado puede desarrollar lesiones intestinales hiperplásicas leves, pero sin presencia evidente de diarrea o pérdida de peso (McOrist, 2005). Los animales sin diarrea, infectados subclínicamente, actúan como portadores eliminando el microorganismo al medio y son potencialmente infecciosos para sus compañeros de corral e importantes para la diseminación a otras granjas (Jacobson y col., 2010). La diarrea ocurre cuando los cerdos afectados presentan cambios patológicos particularmente en el intestino grueso, lo que resulta en una pérdida de agua que no puede ser compensada (McOrist y col., 2006).

La disminución del consumo de alimento, sumado a la pérdida de proteína corporal y a la menor absorción de nutrientes asociada a la presencia de enterocitos inmaduros son las causas probables del menor aumento de peso y la mayor CA en los cerdos afectados

(Vanucci y col., 2010). Estudios recientes demostraron que la infección con *L. intracellularis* podría influir en la disminución del metabolismo de aminoácidos y en la síntesis de ácidos nucleicos asociados a la mala absorción intestinal (Grutzner y col., 2015).

El período de incubación de la enfermedad es de 2 a 3 semanas. La eliminación de la bacteria en materia fecal comienza a los 7 días posinfección, con un pico de excreción entre los 14 y 21 días (Smith y McOrist, 1997) aunque un porcentaje pequeño de animales la eliminan, de forma intermitente, por más de 12 semanas (Guedes y Gebhart, 2003; Brant y col., 2010). En la mayoría de los casos de EPP no complicados, la recuperación intestinal ocurre entre 4 y 10 semanas después del inicio de los signos clínicos. Esta recuperación se asocia con niveles de consumo de alimento y tasas de crecimiento normales (McOrist y Gebhart, 2012). Estudios en los que se analizó la dinámica de la infección, muestran que *L. intracellularis*, en granjas de un solo sitio con flujo continuo, puede detectarse a las pocas semanas postdestete (6-8 semanas de vida) (Steger y col., 2004; Jensen y col., 2005), mientras que en granjas de múltiples sitios la detección es más tardía, durante la etapa de crecimiento (de 14 a 20 semanas) (McOrist y Gebhart, 2012). Además de estar influenciada por el sistema de producción, la dinámica de infección resulta marcadamente afectada por el uso de antibióticos, incluso como promotores del crecimiento. Así, en países como EE.UU. o Brasil, donde los cerdos destetados reciben antibióticos como promotores del crecimiento o de forma preventiva para enfermedades respiratorias y digestivas, la infección se retrasa hacia la etapa de engorde (McOrist y Gebhart, 2012; Resende y col., 2015).

Lawsonia intracellularis presenta moderada resistencia en el medio ambiente, pudiendo sobrevivir, en materia fecal a 15 °C, hasta 2 semanas aunque la bacteria es sensible a la mayoría de los desinfectantes tales como amonios cuaternarios o iodo-povidona (Collins y col., 2000). Es probable que en el medio ambiente de muchas granjas, se mantenga un nivel constante de *L. intracellularis* dada su presencia en la materia fecal residual de corrales y que ésta sea la fuente de contagio para nuevos grupos de cerdos (McOrist y Gebhart, 2012). Además, se han consignado como posibles vectores biológicos,

a los insectos, roedores y otros animales de vida silvestre (Friedman y col., 2008). Entre los factores responsables de la gravedad de la enfermedad se incluyen el movimiento y mezcla de cerdos, los cambios nutricionales, la densidad animal y la edad de los cerdos (Mauch y Bilkei, 2005; Vanucci y Gebhart, 2014).

La enfermedad es endémica en la mayoría de las granjas, con una morbilidad de alrededor del 10 % y una mortalidad de menos del 1 % en la forma crónica, mientras que en la forma de EPH la morbilidad puede alcanzar valores del 12 % y la mortalidad puede llegar a 10 % o más, presentando una letalidad del 50 % (Love y col., 1997; McOrist y Gebhart, 2012).

iii. Enfermedades producidas por espiroquetas

Existen actualmente varias espiroquetas que pueden afectar o vivir en el colon de los cerdos (Burrough, 2016). Las dos enfermedades espiroquetales de importancia clínica en nuestro medio son: la DP, producida por *Brachyspira hyodysenteriae* y la EIP producida por *Brachyspira pilosicoli*. Ambas son bacterias beta-hemolíticas, anaeróbicas, Gram negativas, levemente espiraladas y móviles (Hampson y col., 2006; Hampson y Duhamel, 2006).

La DP se caracteriza por diarrea mucohemorrágica de aspecto pastoso-líquido, que lleva a los animales afectados a la postración, anorexia y potencialmente a la muerte en pocos días. Comúnmente, afecta a cerdos de 2 a 6 meses de edad, aunque puede presentarse desde las dos semanas posteriores al destete. Los signos clínicos suelen presentarse de manera cíclica, con reapariciones a intervalos de 3 o 4 semanas (Hampson y col., 2006; Hampson, 2012). Se ha observado que en granjas con antecedentes de diarrea, la proporción de muestras positivas a *B. hyodysenteriae* son mayores que en aquellas sin diarrea (Biksi y col., 2007).

Macroscópicamente, el ciego y el colon, presentan aumento de espesor de su pared, con edema e hiperemia de mucosa y submucosa. La lesión característica es una tiflocolitis

catarral y/o fibrinonecrótica y hemorrágica con distribución multifocal, en parches o difusa (Uzal y col., 2016). En los inicios de la enfermedad, la mucosa está cubierta por mucus, fibrina y flecos de sangre fresca que tiñen el contenido colónico. Cuando la enfermedad progresa, se suma la formación de membranas fibrinonecróticas adheridas a la mucosa (Hampson, 2012; Uzal y col., 2016). Microscópicamente, las criptas se encuentran elongadas, dilatadas con contenido mucoso y detritus celulares en su luz, observándose también hiperplasia de células caliciformes. La lámina propia presenta edema e infiltración de neutrófilos y linfocitos (Uzal y col., 2016). La hiperplasia de células caliciformes se observa después del quinto día, con una copiosa producción de mucus dentro de la luz (Burrough, 2016). La hemorragia, que puede ocurrir en zonas erosionadas de la mucosa, contribuye a la formación de pseudomembranas formadas por una capa de mucus, fibrina, eritrocitos y bacterias (Uzal y col., 2016). Generalmente la necrosis de la mucosa es superficial, siendo más rara la ocurrencia de úlceras. Las espiroquetas se pueden observar en mayor número en el exudado y en la luz de las criptas en la fase aguda de la enfermedad (Hampson, 2012). Se pueden observar protozoos ciliados como *Balantidium coli* a lo largo de la superficie de la mucosa en las áreas de erosión. Estos aumentan y perpetúan el daño intestinal (Burrough, 2016).

La EIP, causa colitis leve con diarrea en cerdos, generalmente en las etapas de posdestete y crecimiento, cuando los animales son mezclados o consumen una nueva dieta (Barcellos y col., 2010). También puede ocurrir en cerdos de terminación y ocasionalmente en cachorras de reemplazo recientemente introducidas a una granja positiva o en cerdas preñadas (Hampson, 2012). El cuadro clínico inicia con pérdida del estado corporal y diarrea transitoria, con alto contenido de agua y mucus, generalmente sin sangre. Estos signos ocurren principalmente en cerdos de terminación, mientras que en los más jóvenes puede incluso aparecer hilos de sangre (Hampson, 2012). Aunque la infección en una granja puede observarse en varias edades simultáneamente, generalmente es raro encontrar animales de más de 140 días con diarrea (Hampson y Duhamel, 2006; Barcellos y col., 2010). La diarrea

generalmente se autolimita entre 7 y 14 días, pero algunos cerdos pueden reincidir (Hampson, 2012). Las lesiones macroscópicas se limitan al colon y ciego y consisten en una colitis catarral difusa. El intestino presenta contenido líquido con gas y la mucosa se encuentra hiperémica y con erosiones. En estadios más graves o animales más jóvenes, pueden observarse erosiones multifocales y colitis mucohemorrágica y fibrinosa (Uzal y col., 2012). El estudio histopatológico evidencia hiperplasia de las células caliciformes, con elongación de las criptas, contenido mucoso y restos celulares en su luz. En estadios posteriores, células inflamatorias mononucleares infiltran la lámina propia acompañando los cambios hiperplásicos de las células caliciformes (Uzal y col., 2016). Se describe, en algunos casos, un acúmulo de espiroquetas adheridas a los enterocitos de la mucosa dando un aspecto de “falso ribete en cepillo”. Además, las espiroquetas pueden verse entre el mucus, dentro de la luz de las criptas y entre las células caliciformes (Hampson y Duhamel, 2006; Barcellos y col., 2010; Hampson, 2012).

En los brotes de DP la morbilidad varía entre 30 y 100 % y la mortalidad puede alcanzar el 30 %. Los cerdos infectados que no mueren se recuperan en 1 a 2 semanas, pero su tasa de crecimiento permanece deprimida hasta la faena (Uzal y col., 2016). En EIP la morbilidad es alta, llegando a valores del 50 %, mientras que la mortalidad es baja (Barcellos y col., 2010).

El periodo de incubación de *B. hyodysenteriae* y de *B. pilosicoli*, varía entre 7 a 21 días, produciéndose la eliminación de las bacterias en las heces 1 a 4 días previos al inicio de la diarrea (Burrough, 2016). Ambas bacterias son resistentes en agua de fosas, lagunas y fómites contaminados con materia fecal por periodos prolongados, aunque son susceptibles a la mayoría de los desinfectantes (Ordóñez y col., 2013). Se demostró que *B. pilosicoli* tiene mayor supervivencia medioambiental que *B. hyodysenteriae*, alcanzando más de 60 días (Hampson y Duhamel, 2006; Hampson y col., 2006; Barcellos y col., 2010). En la epidemiología de la enfermedad la presencia de un pequeño número de cerdas portadoras juega un rol importante en la persistencia de la infección dentro de una granja (Duff y col.,

2014). Se especula que el estrés del parto en esas hembras, podría asociarse con la eliminación de la bacteria en materia fecal y con la aparición de lechones lactantes portadores. Asimismo, estas cerdas sin signos, pueden infectar otras granjas y ser la causa de la diseminación de la enfermedad (Duff y col., 2014). En relación a esto, se consignó que los brotes de DP se presentan frecuentemente luego de la introducción sin cuarentena y/o tratamiento profiláctico de animales portadores (Ordóñez y col., 2013).

La composición de la dieta es un factor importante que contribuye al desarrollo, tiempo de aparición y gravedad de la enfermedad (Burrough, 2016). Los componentes de la dieta se postularon como factores de riesgo para DP ya que determinan los microorganismos presentes en el microbiota intestinal y estos se relacionan con la patogenia de *Brachyspira* spp. La enfermedad no se ha podido reproducir en cerdos gnotobióticos, salvo en aquellos inoculados con raspados de mucosa de animales con disentería, indicando que *B. hyodysenteriae* necesita para producir daño, al menos uno o más microorganismos de la microbiota intestinal (Burrough, 2016). Aunque se presenta alguna discordancia en la literatura, generalmente se acepta que los cerdos alimentados con dietas de alta digestibilidad se asocian a una disminución de la presentación de DP. Además, el uso de probióticos, prebióticos y simbióticos se han planteado como nuevas alternativas en las dietas para reemplazar a los antibióticos y mejorar la GDP y CA de los cerdos en granjas infectadas (Hampson, 2012).

En granjas de flujo continuo, de un solo sitio y con pobre bioseguridad, se considera que *Brachyspira* spp. es transmitida principalmente por contacto directo con heces de cerdos infectados (Ordóñez y col., 2013). En las granjas endémicas, hay presentaciones recurrentes debido al inadecuado lavado y desinfección de los corrales y al contacto con cerdos de otros corrales (Hampson, 2012). Conjuntamente, la persistencia de la enfermedad se relaciona con la detección del microorganismo en la materia fecal de ratas, ratones, aves y perros, lo cuales diseminan y mantienen la enfermedad en la granja infectada (Hampson, 2012). En los últimos años, se reportaron como potenciales fuentes de contagio indirecto de

la enfermedad, los fómites, el ingreso de visitas al establecimiento, el ingreso del alimento, los roedores y animales silvestres (Ordenéz y col., 2013). Entre los probables reservorios de *Brachyspira* spp. se incluyen cerdos silvestres, jabalíes, gallinas, patos silvestres, ñandúes, gaviotas, roedores, perros, cucarachas, moscas y otros insectos. Estos, podrían desempeñar un papel importante en la transmisión de la enfermedad entre las granjas vecinas e incluso separadas por grandes distancias (Ordenéz y col., 2013). También, las aves migratorias acuáticas son una potencial fuente de transmisión de espiroquetas entre granjas y países, habiéndose aislado recientemente *B. suanatina*, *B. hyodysenteriae* y *B. hampsonii* en sus heces (Burrough, 2016).

iv. Salmonelosis porcina

El género *Salmonella* incluye un grupo de bacterias morfológica y bioquímicamente homogéneo, Gram negativas, móviles, no esporuladas, y anaerobias facultativas (Carlson y col., 2012). La infección por *Salmonella* en cerdos, tiene importancia por dos motivos principales: por un lado, la posibilidad de provocar enfermedad clínica, la salmonelosis, que se manifiesta con enterocolitis y/o septicemia. Por otro lado, la probabilidad de contaminación de la carcasa del cerdo con una amplia variedad de serotipos que, si bien no causan enfermedad en el animal, son fuente de infección para el hombre a través de la carne y de sus subproductos (Griffith y col., 2006).

La salmonelosis se puede manifestar en todas las edades, pero principalmente se observa en animales desde aproximadamente 50 días hasta los 4 meses de edad. *Salmonella* Choleraesuis, ampliamente adaptada al cerdo, es responsable de la mayoría de los casos de salmonelosis septicémica, mientras que los cuadros entéricos se asocian principalmente a *S. Typhimurium*. En los cuadros entéricos se observa diarrea acuosa intensa, color verde amarillento sin sangre o moco, al menos inicialmente (Carlson y col., 2012). Los animales además presentan anorexia, fiebre, pérdida de peso y debilidad progresiva. La enfermedad puede ser aguda o crónica, con una duración variable desde 3

días hasta varias semanas. Las lesiones intestinales son más comunes en yeyuno distal, íleon y colon espiroide y consisten en una moderada a severa enterocolitis que varía desde catarral a fibrinonecrótica (Reed y col., 1986; Meyerholz y col., 2002). En la luz intestinal se observa mucus, fibrina y ocasionalmente sangre. En estadios crónicos, las lesiones ocurren principalmente en ciego y colon, con focos de ulceración y necrosis (ulceras en botón). Los linfonódulos mesentéricos se observan brillantes y aumentados de tamaño (Stevenson y col., 2004; Griffith y col., 2006). La lesión microscópica se caracteriza por una enteritis fibrinonecrótica grave, profunda, que varía de focal a difusa. En la lámina propia se observa trombosis microvascular y necrosis endotelial debido a la liberación de endotoxinas que causan necrosis fibrinoide de los vasos. Además se observa infiltrado celular inflamatorio, con predominio de macrófagos y linfocitos (Griffith y col., 2006). Las Placas de Peyer pueden presentar necrosis, hipertrofia linfoide o hiperplasia regenerativa. En ocasiones, la necrosis puede llegar a involucrar la muscular de la mucosa y la submucosa. Al igual que en otras colitis, entre los restos necróticos puede reconocerse al parásito *Balantidium coli* (Uzal y col., 2016).

La mayoría de los cerdos que enferman se recuperan completamente, aunque algunos pueden permanecer como portadores, presentar retraso en el crecimiento y/o diarrea crónica y eventualmente, desarrollar estenosis rectal (Carlson y col., 2012).

Como se mencionó previamente, los serotipos que causan enfermedad clínica primaria comprenden *S. Typhimurium* y *S. Choleraesuis*. Ocasionalmente y asociado con factores predisponentes, *S. Heidelberg*, *S. Dublin* y *S. Derby* pueden producir diarrea en cerdos (Carlson y col., 2012). *Salmonella Choleraesuis* se aísla casi exclusivamente de cerdos con signos clínicos o lesiones y es inusual su detección en alimentos de origen porcino y en reservorios no porcinos (Griffith y col., 2006). La presentación septicémica ocurre con mortalidad alta y la morbilidad, si bien variable, usualmente es inferior a 10 % (Reed y col., 1986; Griffith y col., 2006). La enfermedad asociada a *S. Typhimurium* se caracteriza por diarrea inicial en un grupo de 10 % a 15 % de cerdos, pero rápidamente

puede extenderse a la mayoría de ellos. La mortalidad generalmente es baja, no superando el 2 % (Griffith y col., 2006; Carlson y col., 2012).

Si bien la principal ruta de transmisión de *Salmonella* spp. es el contacto fecal-oral, también pueden tener un rol importante el contacto directo con secreciones de animales portadores o enfermos, o bien el contacto con ambientes contaminados (Parada y col., 2009). El estrés asociado a la mezcla de lotes, el transporte, la privación de alimento o la presencia de enfermedades concomitantes, aumentan la eliminación y el riesgo de desarrollar el cuadro clínico (Griffith y col., 2006). Guenther y col., (2010), reportaron que el 33 % y el 41 % de los cerdos inoculados experimentalmente con bajo número de *Salmonella* Typhimurium evidenciaron fiebre y diarrea respectivamente, mientras que el resto presentó un cuadro subclínico. Si bien en este estudio, el 42 % de los animales eliminó la bacteria por materia fecal durante 28 días, en otros casos algunos cerdos pueden permanecer como portadores excretando la bacteria en heces hasta por 5 meses (Carlson y col., 2012; Guenther y col., 2010). Estos portadores inaparentes eliminan bacterias en forma continua o intermitente, en bajo número con la materia fecal (Vigo y col., 2009).

En relación a la dinámica de infección en las granjas, un estudio longitudinal realizado en Argentina, identificó que el 90 % de los lechones, luego de 2 semanas posdestete, eliminaron la bacteria por materia fecal, mientras que estos valores disminuyeron al aumentar la edad de los animales, no habiéndose registrado detección en cerdos previos a la faena (Vigo y col., 2009). Dinámicas similares fueron reportadas por otros autores (Pieres y col., 2013; Rostagno y col., 2012), mientras que otros estudios reportaron un aumento de la prevalencia intrapredio en fases finales del engorde. En un reciente estudio de prevalencia nacional, se consignó que 1 de cada 10 cerdos en edad de faena eliminan *Salmonella* spp. en sus heces (Parada, 2014). La variabilidad en la identificación de animales positivos a nivel individual, así como entre y dentro de lotes de cerdos, sugiere que hay distintos factores de riesgo que influyen en la dinámica de la infección por *Salmonella* spp. (Pieres y col., 2013).

La salmonelosis, a pesar de no ser una enfermedad de notificación obligatoria en Argentina, constituye una de las principales causas de enfermedad en humanos y es uno de los patógenos más frecuentemente aislados en enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) (Caffer, 2007). Por otro lado, existe una creciente preocupación en relación a la múltiple resistencia antibiótica desarrollada por este género bacteriano y por la posibilidad de persistencia de residuos de antibióticos en los productos y subproductos de origen animal (Ibar y col., 2009; Jacobson y col., 2003).

v. Infecciones mixtas

Varios estudios han descripto la presencia de más de un agente causal de diarrea en cerdos de engorde a nivel de granja. Sin embargo, a nivel individual, los porcentajes son muy variables, desde 4,8 % a 20,5 % (Baccaro y col., 2003; Suh y Song, 2005; Dors y col., 2015). Un estudio realizado en Brasil entre los años 2008 y 2009 reportó la ocurrencia de infecciones mixtas en el 30,4 % de las granjas y la detección de más de un patógeno en el 13,1 % de las muestras (Viott y col., 2013). Estudios comparativos de granjas con y sin problemas de diarrea, revelaron que es frecuente encontrar más de un agente en granjas con cuadros de diarrea y que el riesgo de aparición de enfermedad clínica podría aumentar si dos o más patógenos están presentes en el mismo cerdo. Este incremento se asoció a un mayor daño intestinal (Stege y col., 2000; Jacobson y col., 2003).

vi. Aspectos generales del diagnóstico

El diagnóstico exacto, rápido y preciso es importante en todas las enfermedades infecciosas, pero en el caso de las enfermedades digestivas lo es mucho más, debido al gran impacto negativo económico y productivo que generan (Caravajal y col., 2011). Tradicionalmente, el diagnóstico de laboratorio de las enfermedades del tracto digestivo abarcaba el examen completo de unos pocos cerdos gravemente afectados o de animales muertos. Este enfoque puede dejar de lado o subdiagnosticar a las enfermedades de baja

mortalidad, como así también a las presentaciones subclínicas (Duhamel y Mathiesen, 1999). Debido a ello, el diagnóstico poblacional a partir de animales vivos utilizando técnicas diagnósticas modernas, tomó relevancia en los últimos años. Como desventaja, se resalta que los resultados de esas técnicas se ven afectados por la sensibilidad de cada prueba, la duración de la excreción fecal de cada agente y la tasa de nuevas infecciones dentro una población, por lo que en determinadas ocasiones, pueden resultar falsos negativos (Duhamel y Mathiesen, 1999).

En el animal muerto, el diagnóstico presuntivo de las enfermedades entéricas se basa en los hallazgos macroscópicos y el estudio histopatológico. La aplicación de coloraciones especiales, como la de Warthin Starry (WS) es útil para el reconocimiento de *L. intracellularis* y *Brachyspira* spp. En el caso de *B. hyodysenteriae* las bacterias se encuentran en el mucus que recubre el epitelio del colon, en la luz de las criptas y entre las células caliciformes. En cambio, en el caso de *B. pilosicoli*, en algunos estadios de la infección suele formarse el “falso ribete en cepillo” (Duhamel, 2001; Barcellos y col., 2010). La demostración con WS de espiroquetas en la luz intestinal, aun en presencia de colitis, sólo es sugerente de infección con *Brachyspira* spp. (Jensen y col., 2000) ya que existen especies no patógenas de *Brachyspira* habitualmente presentes en la luz del colon (*B. innocens*, *B. murdochii*) (Weissenbock y col., 2005). En el caso de *L. intracellularis*, mediante la tinción de WS, las bacterias se identifican en el interior de los enterocitos, principalmente en el borde apical de las células hiperplásicas (Machuca, 2007; Ladinig y col., 2009). La identificación por inmunohistoquímica (IHQ) se utiliza, de manera rutinaria, para *L. intracellularis* y constituye un método sensible y específico, permitiendo además, relacionar las lesiones con la presencia de la bacteria en el interior del enterocito (Jensen y col., 1997; Gebhart y Guedes, 2001; Huerta y col., 2003). *Lawsonia intracellularis* puede ser detectada por IHQ en escasas células de las criptas intestinales al comienzo de la enfermedad y en los macrófagos de la lámina propia y de los linfonódulos mesentéricos en estadios de resolución (Machuca y col., 2007). Estos dos períodos no pueden ser

diferenciados mediante el estudio histopatológico clásico o histoquímico. Para la identificación de especies de *Brachyspira*, la IHQ es compleja debido a la reacción cruzada entre las distintas especies (Westerman y col., 1995). Es por esta causa, que para tejidos fijados se puede utilizar la hibridación *in situ* (HIS), que logra identificar las diferentes especies de espiroquetas, o técnicas de PCR a partir de tejidos embebidos en parafina (TEP) (Weissenbock y col., 2005; Jensen y col., 2004).

Para el estudio a partir de material de archivo se pueden utilizar los TEP para obtención de ADN y la posterior aplicación de PCR de fragmentos cortos de ADN (Weissenbock y col., 2005; Ladinig y col., 2009). Principalmente en medicina humana, los TEP son una fuente de invaluable información para investigación de enfermedades. Como desventaja se cita la ruptura del ADN debido a la fijación con formol (Bustamante, 2011).

Históricamente, en el diagnóstico de las enfermedades bacterianas, tanto en animales vivos como muertos, el aislamiento bacteriológico fue considerado como la “prueba de oro” (Funk y col., 2003; Barcellos y col., 2010). En el caso de *Salmonella* spp. el aislamiento positivo siempre debe ir acompañado del reconocimiento de las lesiones anatomopatológicas características, debido a que la sola identificación de *Salmonella* spp. no significa necesariamente enfermedad, dada su amplia distribución y variedad de serotipos no patógenos para el cerdo (Griffith y col., 2006). Es por ello, que resulta importante realizar la serotipificación que permite detectar los distintos serotipos de *Salmonella* en los animales, proveniente de granjas y frigoríficos (Griffith y col., 2006; Vigo y col., 2007). El aislamiento y la identificación de *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* y serovariedades de *Salmonella* resultan dificultosos, laboriosos, insumen días a semanas y requieren de laboratorios con amplia experiencia (Barcellos y col., 2000; Rasbäck y col., 2006). Por su parte, *L. intracellularis* es una bacteria que no se puede cultivar con técnicas de rutina (Elder y col., 1997; Nathues y col., 2007).

Para superar estos problemas, se desarrollaron distintos tipos de PCR a partir de heces para la detección de *L. intracellularis* (Jones y col., 1993) y más recientemente, una

PCR dúplex que permite diferenciar las dos especies de *Brachyspira* más importantes (Baccaro y col., 2003; La y col., 2003). También se encuentra disponible una PCR múltiple para *B. hyodysenteriae*, *L. intracellularis* y *Salmonella* (Elder y col., 1997) y para detectar *L. intracellularis*, *B. pilosicoli* y *B. hyodysenteriae* (La y col., 2006). Esta última combinación, permite obtener excelentes resultados en comparación con PCR simples y cultivos bacterianos (La y col., 2006). El énfasis en el uso de PCR múltiple radica en la posibilidad de la detección simultánea de los agentes mencionados, con elevada especificidad (cercana a 100 %) y moderada sensibilidad, a partir la materia fecal de animales vivos (Pedersen y col., 2010; La y col., 2006). Por estas razones, se la considera una potente herramienta diagnóstica para las infecciones subclínicas en granjas con o sin historial de diarrea (Jacobson y col., 2003; Lading y col., 2009).

Para el diagnóstico poblacional de *L. intracellularis* y *Salmonella* spp. en animales vivos o sacrificados en mataderos se utilizan técnicas serológicas que ponen en evidencia el contacto del animal con el agente. En el caso de *B. hyodysenteriae*, recientemente se ha desarrollado un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Song y col., 2015). Los estudios serológicos proporcionan evidencia indirecta de la situación sanitaria pasada de un cerdo individual y/o de un grupo. Debido a que los anticuerpos tienen duración de 2-3 meses, estos estudios suelen arrojar mayor cantidad de positivos en relación al cultivo o PCR de materia fecal (Brand y col., 2010; Song y col., 2015).

vii. Prevalencia de enteropatía proliferativa porcina, disentería porcina, salmonelosis porcina y espiroquetosis intestinal porcina en Argentina y el mundo

En Argentina, los datos que se conocen han surgido en su mayoría de trabajos dirigidos a evaluar la prevalencia individual de patógenos intestinales. Así, en relación a *L. intracellularis*, se detectaron anticuerpos en 76,7 % de las granjas estudiadas, con una prevalencia intrgranja promedio de 31,2 % (Machuca, 2007). El alto porcentaje de granjas

seropositivas, demuestra la amplia difusión de la infección en el país, favorecida por el sistema de producción monositio y el flujo continuo del engorde (Machuca y col., 2009). Más recientemente, Bertone (2012), mediante estudios de PCR a partir de materia fecal de animales con diarrea, encontró 26,7 % de cerdos positivos a *L. intracellularis*. En relación a *Brachyspira* spp., en un estudio realizado en granjas con sospecha de DP se aisló *B. hyodysenteriae* en 73,3 % de las muestras (Giacoboni, 1998), siendo el serotipo 8 el más frecuente en la provincia de Buenos Aires (Moredo y col.1999). En otro estudio, al realizar PCR de materia fecal en animales con diarrea, se detectaron 6/24 establecimientos positivos, 4 con detección de *B. pilosicoli* y 2 con detección de *B. hyodysenteriae* (Illanes y col., 2008). En un estudio bacteriológico reciente, sobre 52 granjas evaluadas sólo una resultó positiva a *B. hyodysenteriae* y dos lo fueron a *B. pilosicoli*. En este caso, la tasa de detección intragranja también fue baja, obteniendo una prevalencia nacional de 1,9 % y 3,8 %, respectivamente (Carranza y col., 2014). Por último, en relación a *Salmonella*, un estudio serológico en nuestro país demostró su amplia distribución en granjas tanto confinadas como al aire libre observándose, en el 40 % de los establecimientos, prevalencias mayores al 70 % (Parada y col., 2010). En otro trabajo, en el cual se realizaron estudios bacteriológicos, se observó que el 27,3 % de las granjas fueron positivas para *Salmonella* spp. en materia fecal, mientras que en la faena lo fueron entre 15 % y 40 % de los animales (Vigo y col., 2006). Estos valores disminuyeron al aumentar la edad de los animales en asociación al uso de antibióticos (Vigo y col., 2009). Recientemente, Parada (2014) reportó una prevalencia nacional en granjas de 42,3 % y de 13,5 % de muestras individuales. Las serovariedades más frecuentemente aisladas en ese estudio fueron *S. Typhimurium* y *S. Derby* (Parada, 2014), mientras que en estudios previos, realizados a partir de muestras tomadas en frigoríficos, se identificaron además de *S. Typhimurium*, otras serovariedades no patógenas para el cerdo (Vigo y col., 2006; Vigo y col., 2007; Ibar y col., 2009).

En relación a lo que ocurre en otros países, *L. intracellularis* presenta una distribución mundial y fue detecta en países de América del Norte, América del Sur, Europa,

Asia, África y Australia (McOrist y Gebhart, 2006). Se estima que entre el 24 y el 47 % de las granjas son positivas a *L. intracellularis*, llegando a extremos de 93 % (Stege y col., 2000). Los porcentajes de detección intragránja varían, siendo 19 % en Corea, 11 % y 13 % en Brasil, 25 % en Dinamarca y hasta 48 % en Alemania (Stege y col., 2000, Baccaro y col., 2003; Suh y Song, 2005; Reiner y col., 2011; Viott y col., 2013). En algunos países, con la prohibición del uso de antibióticos como promotores del crecimiento, la prevalencia reportada disminuyó debido a la implementación simultánea de estrictas medidas de bioseguridad y de alojamiento, tales como el “todo dentro-todo fuera” (Jacobson y col., 2010).

Los cambios que favorecieron la intensificación en la producción de cerdos, dieron lugar también, a una disminución de la prevalencia de *B. hyodysenteriae* en la mayoría de los países productores de cerdos (Dors y col., 2015). Sin embargo, DP sigue considerándose una enfermedad importante en Europa y en Brasil. En este último país, en 2010, se reportó un brote de *B. hyodysenteriae* en una granja multiplicadora que se expandió, posteriormente, por varios estados del país a partir de cachorras portadoras (de Suoza y col., 2013). *Brachyspira pilosicoli*, también ha sido identificada en la mayoría de los países productores de cerdos, con prevalencias intragránja del 5 al 10 % (Stege y col., 2000) y en más del 30 % de las granjas evaluadas, tanto en granjas con o sin diarrea (Møller y col., 1998). En Alemania, el 31 % de la granjas fueron positivas con 3,2 % de detección intragránja (Reiner y col., 2011).

La salmonelosis porcina presenta una prevalencia mundial que varía de 3 % a 21 % (Griffith y col., 2006). En Brasil, en el año 2003, se reportó 4,8 % de muestras individuales positivas por PCR múltiple y 6,52 % de granjas positivas por bacteriología (Baccaro y col., 2003; Viott y col., 2013). En Canadá, estudios bacteriológicos a partir de muestras de materia fecal, detectaron un 14,3 % de granjas positivas (Rajic y col., 2002). En muchos países la prevalencia probablemente sea baja como consecuencia del uso de antibióticos adicionados al alimento (Hampson, 2000). En Suecia, la prohibición a partir de 1986 de los

antibióticos como promotores de crecimiento, llevó a un aumento de las enfermedades entéricas posdestete (Jacobson y cols. 2005), pero con la aplicación de estrictos programas de control, la prevalencia en países europeos nórdicos disminuyó años después (Alban y col., 2012).

viii. Impacto productivo y económico

En las primeras semanas después del arribo a las unidades de engorde, los animales pueden presentar diarrea. La misma, estaría inducida por el estrés asociado al transporte, la mezcla de animales y los cambios dietarios. Suele ser leve, de tipo osmótica y al parecer no afecta la salud o el crecimiento de los cerdos (Jensen, 1995). En coincidencia con esa etapa, los anticuerpos maternos contra patógenos entéricos se encuentran en su nivel más bajo (Guedes y col., 2002) y por lo tanto, el riesgo de diarreas infecciosas aumenta, más aun si los cerdos son expuestos a agentes patógenos residuales presentes en los corrales (McOrist y Smits, 2007).

Las pérdidas económicas provocadas por EPP son difíciles de estimar ya que incluyen variaciones en la mortalidad, GDP, CA, heterogeneidad de lotes, medicación y días de alojamiento. El impacto económico en una granja va a depender de la cantidad de animales afectados y de la gravedad del cuadro clínico (McOrist y col., 2006). En Australia, se calcularon pérdidas anuales de U\$S 20 por cerda y, en el caso de la producción porcina de EE.UU., de U\$S 20 millones anuales (Guedes, 2004). Otro estudio, indica que la infección en las cerdas de reposición impacta negativamente en el número de lechones nacidos vivos ocasionando pérdidas de más de €100 por cachorra (McOrist, 2005). Se consignó que la presentación subclínica arroja pérdidas de entre U\$S 2,5 a 10 por cerdo vendido (Morel Saives y Le Pannerer, 2008). Estudios comparativos entre animales vacunados y no vacunados, determinaron que la ileítis es la enfermedad subclínica de mayor impacto económico en producción porcina, alcanzando 7,61 €/cerdo (McOrist y Smits, 2007; Scholz y col., 2011). En un estudio de inoculación experimental, la GDP se redujo entre 37 % y 42 %, y

la CA se incrementó de 27 % a 37 % en los grupos con EPP subclínica (Paradis y col., 2012). Se ha demostrado, en varios estudios, que los cerdos afectados con ileítis reducen su GDP desde 9 % a 31,1 % y aumentan la CA de 6,7 % a 33,3 % (McOrist y col., 1997). En un estudio realizado a campo, se reportó crecimiento compensatorio luego del cese de la eliminación de *L. intracellularis* en materia fecal, indicando que la pérdida de peso ocurre solo durante el periodo de la infección. Los cerdos recuperan el apetito y la GDP, alcanzando el peso de faena, pero en mayor cantidad de días (McOrist y Gebhart, 2012).

La infección por *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* causa pérdida de peso y retraso en el crecimiento como consecuencia de la reducción de la absorción de líquidos y de la producción de ácidos grasos volátiles en el intestino grueso (Thomson y cols., 1997). Los cerdos inoculados experimentalmente con *B. hyodysenteriae* presentaron una reducción en la ganancia diaria de peso entre 13 y 62 % y una disminución en la eficiencia de conversión de 10 a 90 %. Tanto en DP como en EIP el mayor impacto económico resulta del aumento en el número de días requeridos para que alcanzar la faena y, en consecuencia, los mayores costos de alojamiento, además de interferir de manera directa en la alimentación, en una fase donde el alimento representa el 70 % de los costos (Barcellos y col., 2010). En relación a DP, un estudio realizado en Australia, estimó que la medicación para tratar y/o prevenir la enfermedad, lleva a un incremento en los costos de U\$S 2,6 a 8,6 por cerdo. En otro estudio, los costos de medicación en una granja con DP endémica se redujeron de U\$S 8,3 a menos de U\$S 1 luego de su erradicación (Hampson, 2012). Todo esto lleva a un incremento en los costos de U\$S 12,6 por cerdo vendido (Hampson y col., 2006). En EE.UU. en situaciones de brotes, las pérdidas estimadas han sido de \$100 millones de dólares anuales debido a alta conversión, baja GDP, costos de medicación y mortalidad (Anónimo, 2013).

Con respecto a SP, en las infecciones por *S. Choleraesuis*, los incrementos en la tasa de mortalidad asociados a los episodios septicémicos, sumado a la caída de los índices de producción y el incremento del índice de conversión, generan un costo estimado de £16.200 por año por cada 100 madres en producción (Muirhead y Alexander, 2001). Se

comprobó que en cuadros subclínicos y con baja eliminación de *Samonella* spp. en materia fecal, la bacteria induce una alteración en la maduración y uniformidad normal de la microbiota intestinal, demostrando la compleja interacción entre el huésped y las bacterias patógenas y no patógenas. Estos cambios podrían asociarse al mal desempeño productivo del cerdo (Bearson y col., 2013).

En Argentina, no hay un cálculo económico de las pérdidas productivas causadas por las enfermedades entéricas en la etapa de crecimiento y terminación, pero se supone que son muy elevadas, dados los costos de alimentación y de tratamientos, y los sistemas de crianza de la mayoría de las granjas argentinas. La estimación de la disminución de la GDP y los costos asociados a estos agentes serían un aporte muy importante para la sanidad porcina.

2. Objetivos e hipótesis

i. Objetivo general

- ❖ Evaluar la participación de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella* spp. en el desarrollo de infecciones clínicas y subclínicas en cerdos, en las etapas de crecimiento y terminación, a fin de conocer la dinámica de los agentes patógenos mencionados en las granjas estudiadas.

ii. Objetivos específicos

- ❖ Investigar la tasa de detección de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella* spp. en cerdos de crecimiento y terminación, con y sin manifestación clínica de diarrea.
- ❖ Evaluar la relación entre la detección en materia fecal de los agentes patógenos mencionados y el desarrollo de cuadros de diarrea.
- ❖ Evaluar la tasa de detección en tejidos de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella* spp. y su relación con el desarrollo de lesiones intestinales.
- ❖ Determinar la interacción entre los agentes infecciosos mencionados.
- ❖ Evaluar el efecto de la presencia de los agentes nombrados sobre los parámetros productivos y el impacto económico directo, en cuadros clínicos y subclínicos.

iii. Hipótesis más relevantes

- ❖ *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella* spp. se encuentran ampliamente presentes en la etapa de crecimiento y terminación en las granjas porcinas de la República Argentina, y tienen una participación relevante en el desarrollo de infecciones entéricas clínicas y subclínicas.

- ❖ La presencia de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella* spp. tanto en cuadros clínicos como subclínicos, impacta negativamente en el rendimiento productivo y económico durante la etapa de crecimiento y terminación.
- ❖ Existe interacción entre los agentes infecciosos entéricos estudiados.

El trabajo se dividió en 3 etapas. A los efectos de una mejor comprensión, en cada capítulo se incluirán los objetivos, materiales y métodos, resultados, discusión y conclusión de cada etapa. Finalmente se resaltarán las conclusiones generales más importantes del trabajo de tesis.

3. Capítulo 1: Estudio retrospectivo de casos entéricos remitidos para histopatología

Objetivo específico

- ❖ Evaluar la tasa de detección en tejidos de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella* spp. y su relación con el desarrollo de lesiones intestinales.

i. Materiales y métodos

Selección de casos: se realizó una búsqueda en los archivos del Laboratorio de Patología Especial Veterinaria “Dr. Bernardo Epstein”, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, de los casos de cerdos pertenecientes a las etapas de crecimiento y terminación, ingresados entre los años 2000 y 2012, seleccionando aquellos con diagnóstico histopatológico de enteritis.

a. Métodos tradicionales

Estudio histopatológico: en cada muestra de intestino coloreada con hematoxilina y eosina se evaluaron: a) presencia/ausencia de lesión en los enterocitos de la vellosidad, enterocitos de la cripta y células caliciformes; b) presencia/ausencia de alteraciones vasculares en la mucosa y submucosa; c) presencia/ausencia de células inflamatorias en las

túnicas mucosa y submucosa; d) presencia/ausencia de contenidos anormales en la luz de las criptas intestinales y e) presencia/ausencia de lesión en las placas de Peyer. Los criterios utilizados se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios utilizados para la evaluación histopatológica del intestino

Enterocito de la vellosidad	Necrosis difusa, superficial	Cambios vasculares	Leves
	Necrosis difusa, profunda		Intensos
	Necrosis focal, superficial		Sin cambios
	Necrosis focal, profunda		Mononuclear
	Sin cambios		Polimorfonuclear
Enterocito de la cripta	Necrosis	Infiltrado celular	Mixto
	Hiperplasia		Granulomatoso
	Sin cambios		Sin infiltrado
Célula caliciforme	Ausencia	Placas de Peyer	Hiperplasia reactiva
	Hiperplasia		Necrosis
	Necrosis		Infiltrado granulomatoso
	Sin cambios		Sin cambios
Luz cripta	Sin contenido		
	Detritus celulares		
	Mucus		
	Parásitos		

En cada caso, sobre la base de la información bibliográfica disponible y la identificación lesiones características, se arribó a un diagnóstico histopatológico morfológico. El mismo se orientó hacia la acción de un agente etiológico determinado (“asociación etiológica”). Las categorías utilizadas incluyeron a las lesiones compatibles con:

- **Infección por *Brachyspira* spp.**, cuando se observó hiperplasia de las células caliciformes, presencia de mucus en la luz de la criptas y/o necrosis superficial del intestino grueso.

- **Infección por *Salmonella* spp.**, cuando se observó necrosis profunda con trombosis de los vasos en el intestino delgado y/o grueso.

- **Infección por *Lawsonia intracellularis***, cuando se observó hiperplasia del enterocito inmaduro de la cripta en el intestino delgado y/o grueso.

- **Infección por PCV-2**, cuando se observó infiltrado granulomatoso en lámina propia y placas de Peyer tanto en intestino delgado y/o grueso.

- **Infestación por *Trichuris suis***, en aquellos casos con hiperplasia de células caliciformes y estructuras parasitarias en la luz de la cripta en el intestino grueso.

- **Infección mixta**, cuando se observaron lesiones compatibles con más de un agente en el intestino delgado y/o grueso.

- **Enteritis inespecíficas**, en aquellos casos donde se observaron lesiones intestinales que no pudieron atribuirse a ningún agente en particular.

En la infección por *L. intracellularis*, se diferenciaron las distintas presentaciones: EPH, AI, EN e IR. Además, la forma de AI se categorizó en grados (1 a 3) sobre la base de la cantidad de criptas afectadas (Machuca y col., 2008). En los casos en que se observó, se consignó la presencia de infiltrado granulomatoso.

Estudio histoquímico: se utilizó la técnica de WS, como complemento diagnóstico para la visualización de bacterias compatibles con *Brachyspira* spp. Esta técnica se aplicó en los casos con lesiones compatibles con *B. hyodysenteriae* o *B. pilosicoli*, en aquellas enteritis inespecíficas y en todos los cortes de intestino grueso en el que también se identificaron lesiones compatibles con infección por *Salmonella* spp. e infestación con *T. suis*. Por otro lado, se estimó la cantidad de espiroquetas en: escasa, moderada y abundante. Además, la observación del “falso ribete en cepillo” característico de la infección por *B. pilosicoli*, se utilizó como criterio orientativo de diferenciación entre las especies de espiroquetas.

Estudio inmunohistoquímico: los casos con alguna lesión sugestiva de *L. intracellularis* y aquellos con diagnóstico de enteritis inespecífica, se procesaron mediante la técnica de IHQ para la identificación de *L. intracellularis* propuesta por Machuca y col (2008),

determinándose tres (3) patrones de inmunomarcación: 1) enterocito de la cripta; 2) macrófago de la lámina propia; 3) enterocito de la cripta y macrófago de la lámina propia. Además, la inmunomarcación se clasificó en intensa, moderada y leve. Se realizó también la detección de PCV-2 mediante estudios IHQ (Pereda y col., 2011) en los casos con lesiones compatibles con el virus, en los sospechosos de infección mixta y en las enteritis inespecíficas.

b. Métodos moleculares a partir de tacos de parafina

Elaboración del ADN molde: para la obtención de las muestras, se seleccionaron aquellas áreas de los cortes histológicos con lesión característica y con mayor inmunomarcación o visualización bacteriana. La zona marcada fue identificada sobre el taco de parafina y se extrajo un área de 2 milímetros de lado utilizando un bisturí estéril. El segmento intestinal embebido en parafina se colocó dentro de un tubo tipo Eppendorf de 2 ml, estéril.

Para la extracción del ADN se utilizó un kit comercial “QIAamp DNA FFPE Tissue Kit” (Qiagen, Hilden, Germany). La eliminación de la parafina y la posterior extracción del ADN se realizaron según indicaciones del fabricante. La concentración de ADN y la pureza se determinaron por lectura de densidad óptica a 260/280 nm en espectrofotómetro de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se mantuvieron a -20° C hasta su procesamiento.

Detección de los genes específicos de *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* y *L. intracellularis*: para la detección específica se utilizó la técnica de PCR. En la tabla 2 se indican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la detección de cada gen, el tamaño de cada producto amplificado y las referencias utilizadas.

Para la preparación de la mezcla PCR, se utilizó el *buffer* PCR 10 X (Invitrogen, São Paulo, Brasil), mezcla de dNTPs (Invitrogen, California, EE.UU.), oligonucleótidos (Invitrogen, California, EE.UU.), *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, São Paulo Brasil). Las concentraciones utilizadas de cada reactivo y las condiciones de amplificación para cada gen se realizaron según lo descrito por Weissenbock y col. (2005) para *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli*, y Ladinig y col. (2009) para detección de *L. intracellularis*. En todos los casos se utilizó un termociclador *MyCycler™ Thermal Cycler* (Bio-Rad, California, EE.UU.).

Para la visualización de los productos amplificados se realizó la siembra de 10 µl del producto de PCR con 2 µl de una solución de xilenecyanol (Sigma, St. Louis, EE.UU.) 0,25 % y glicerol (Anedra, Buenos Aires, Argentina) en agua 30 %, en gel de agarosa (Biodynamics SRL, Buenos Aires, Argentina) al 2 % en *buffer* Tris Acetato EDTA (TAE) 1 X (Tris 0,48 %; ácido acético glacial 0,11 %) (Dorwil, Química Analítica, Grand Bourg, Argentina); 0,5 M EDTA pH 8 0,2 %) adicionado con 0,5 µg de bromuro de etidio/ml (Sigma, St. Louis, EE.UU.). La corrida electroforética se realizó durante 40 minutos a 100 V en una cuba ADVANCE Co., Ltd. (Tokio, Japón). Como marcador de peso molecular se utilizó Cien Marker (Biodynamics SRL, Buenos Aires, Argentina). Para documentar los geles se utilizó un transiluminador Foto/UV®21 (Fotodyne, Wisconsin, EE.UU.) y el sistema Foto/Analyst Express (Fotodyne, Wisconsin, EE.UU.).

Diagnóstico etiológico: luego de la aplicación de los métodos complementarios de diagnóstico (WS, IHQ y PCR) se procedió a la re-categorización de los casos según los resultados obtenidos. Se utilizaron las mismas categorías que para el estudio histopatológico con las asociaciones etiológicas ya descritas. El criterio para considerar cada animal dentro de una categoría fue el obtener al menos un resultado positivo mediante alguna de las técnicas utilizadas. En los casos compatibles con infección por *Salmonella*

spp. e infestación con *T. suis*, al no disponerse de método confirmatorio, el resultado negativo para los demás agentes se lo consideró confirmatorio del diagnóstico presuntivo.

c. Análisis estadístico

Con el objetivo de establecer la relación entre la “asociación etiológica” y el “diagnóstico etiológico”, se analizaron las frecuencias mediante la prueba de Chi-cuadrado. Para fijar cuáles de las lesiones evaluadas en el estudio histopatológico son las que tienen mayor importancia a la hora de establecer un diagnóstico, se realizaron tabulaciones cruzadas entre los criterios establecidos y el diagnóstico etiológico. Este análisis se complementó con la prueba de Lambda para determinar la utilidad de la “asociación etiológica” como predictor de agentes etiológicos involucrados, expresando un porcentaje de reducción del error. La prueba de Chi-cuadrado también se utilizó para analizar la relación entre los distintos métodos aplicados para la identificación de los agentes (PCR, WS e IHQ) y la asociación etiológica realizada.

Se valoró la relación entre IHQ y PCR de *L. intracellularis* por un lado y el resultado de WS y PCR de *B. hyodysenteriae* por el otro. Asimismo, se estimó, con la misma prueba, si la inmunomarcación del antígeno de *L. intracellularis* y su ubicación se relacionaron con el resultado de PCR. Además, se evaluó la asociación entre la cantidad de espiroquetas coloreadas por WS y el resultado de PCR.

Se rechazó la hipótesis nula con valores de p menores a 0,05 y con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la detección de *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* y *L. intracellularis*, mediante la técnica de PCR.

Nombre de la bacteria	Nombre del gen	Producto a amplificar	Nombre del cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño en pb	Referencia
<i>B. hyodysenteriae</i>	Nox	Región del NADH oxidasa.	Hyo F1	AGGTGACTGTGCTACTGT	320	Weissenbock y col., 2005.
			Hyo R1	AACGTCTGCTGCCTTCTT		
<i>B. pilosicoli</i>	Nox	Región del NADH oxidasa.	Pilo2004-F1	TGAAATCTTCTAAAGATGAG	96	Weissenbock y col., 2005.
			Pilo2004-R1	TAGCTAAAGCAATATATTCA		
<i>L. intracellularis</i>	IS-intracellularis-specific DNA sequence	Secuencia específica de ADN de <i>L. intracellularis</i>	A	TATGGCTGTCAAACACTCCG	319	Jones y col., 1993.
			B	TGAAGGTATTGGTATTCTCC		

PCR=reacción en cadena de la polimerasa; pb= pares de bases.

ii. Resultados

a. Selección de casos

Entre los años 2000 y 2012 ingresaron para diagnóstico histopatológico al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, 1990 casos de porcinos, sobre los cuales se seleccionaron 117 con lesiones entéricas correspondientes a animales de la categoría crecimiento y terminación.

b. Estudio histopatológico

Sobre la base de las lesiones observadas se propusieron las siguientes asociaciones etiológicas:

- **Compatible con infección por *Brachyspira* spp.:** 2/16 casos presentaron colitis catarral; 12/16 colitis fibrinonecrótica superficial y en 2/16 se observó colitis fibrinonecrótica profunda. Todos los cortes presentaron hiperplasia de las células caliciformes y criptas con abundante mucus (imagen 1 A).

- **Compatible con infección por *Salmonella* spp.:** 23 casos presentaron enteritis/colitis fibrinonecrótica profunda. En 12/23 casos, se encontró trombosis vascular. Por otro lado, las células caliciformes y los enterocitos no mostraron cambios hiperplásicos (imagen 2).

- **Compatible con la infección por PCV-2:** 18 casos mostraron enteritis granulomatosa con infiltrado de células epitelioides y gigantes en lámina propia y en placas de Peyer. Ninguno de estos casos evidenció hiperplasia de las criptas (imagen 3 A).

- **Compatible con la infestación por *Trichuris suis*:** 1 caso presentó colitis catarral con abundantes estructuras parasitaria en la luz (imagen 4).

- **Infección mixta:** 2/6 presentaron lesiones compatibles con infección por *B. hyodysenteriae* y PCV-2; 1/6 casos con infección por *L. intracellularis* y PCV-2; 1/6

coinfección por *Brachyspira* spp. y *Salmonella* spp.; 1/6 *Brachyspira* spp. y *T. suis* y 1/6 infección mixta por *L. intracellularis* y *Salmonella* spp.

- **Compatible con enteritis inespecíficas:** 1/12 casos exhibió enteritis eosinofílica, en 2/12 se observó enteritis fibrinonecrótica profunda; 2/12 mostraron colitis catarral y 7/12 enteritis/colitis fibrinonecrótica superficial inespecífica.

- **Compatible con infección por *L. intracellularis*:** 41 casos presentaron enteropatía hiperplásica. Las presentaciones anatomopatológicas de la infección por *L. intracellularis* fueron: Al grado 1= 4 casos; Al grado 2= 9 casos; Al grado 3= 18 casos; EPH= 4 casos; EN=6 casos. No se identificaron lesiones compatibles con IR. (imagen 5A).

En los casos con adenomatosis grados 1 y 2, se observó que en 8 de ellos había una leve hiperplasia de las células caliciformes Además, en 11 casos con AI fue evidente un patrón de respuesta granulomatosa caracterizado por infiltración de macrófagos, células epitelioides y células gigantes en las placas de Peyer y/o en la lámina propia.

c. Lesiones orientativas para realizar una asociación etiológica

En la tabla 3 se indican los componentes histológicos afectados, el tipo de lesión y la asociación etiológica propuesta sobre la base de las lesiones observadas que mostraron asociación estadística significativa ($p < 0,05$). En dicha tabla se indica cual es el agente que resultó más frecuentemente detectado en relación a cada tipo de lesión histológica. Cabe resaltar que los valores de Lambda para lesiones en las células caliciformes y en los enterocitos fueron los más elevados, seguido de los valores para el contenido dentro de la cripta y el tipo de necrosis que sufren los enterocitos de la vellosidad.

Imagen 1.A. Colitis fibrinonecrotica superficial con hiperplasia de las células caliciformes (H&E Obj. 4X).

B. Abundantes estructuras filamentosas, finas y espiraladas en la luz de las criptas (indicadas por flechas) Warthin Starry positivas (WS Obj. 40X).

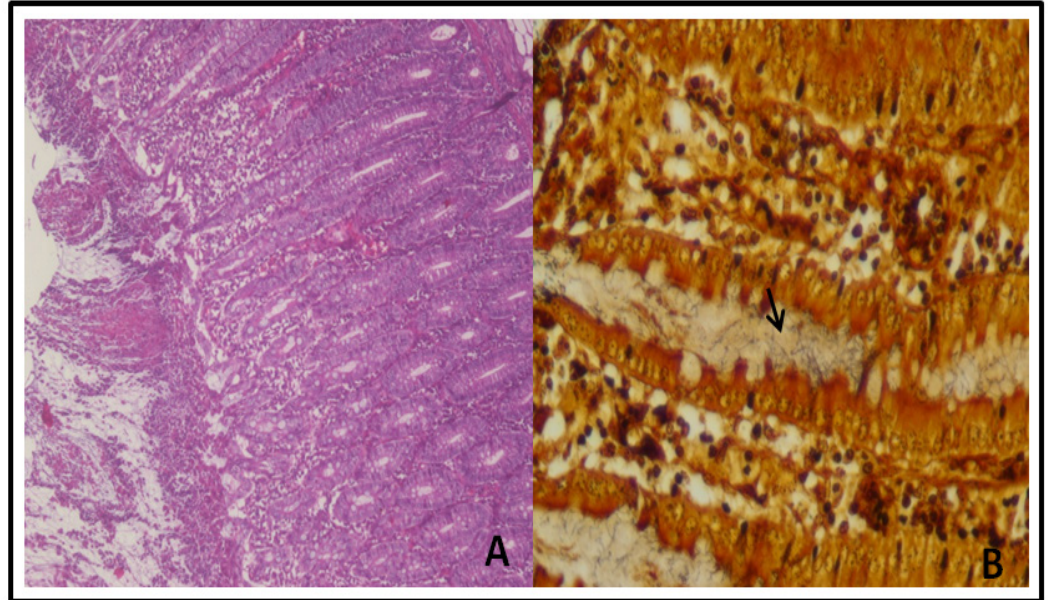


Imagen 2. Colitis fibrinonecrotica profunda con abundante exudación de células inflamatorias hacia la luz y en la lámina propia (H&E Obj. 4X).

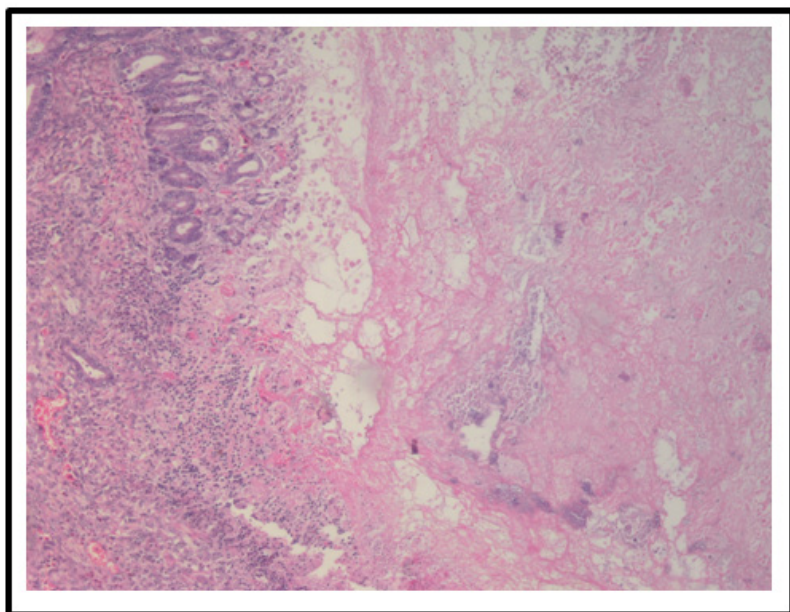


Imagen 3.A Enteritis granulomatosa. Infiltrado con células epitelioides en la lámina propia. (H&E Obj.20X) B. Células histiocíticas y gigantes inmunoreactivas a PCV-2 en placas de Peyer (LSAB. Obj. 20X).

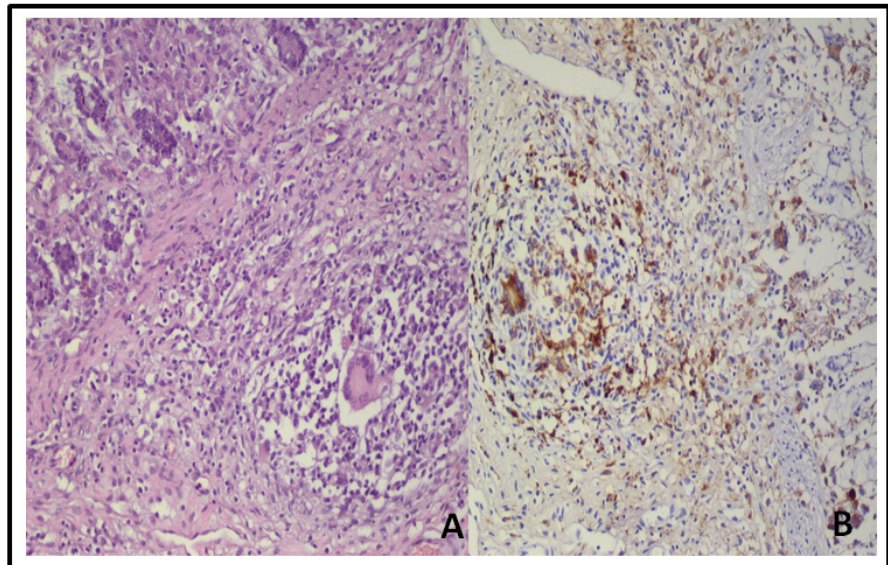


Imagen 4. Colitis catarral con abundantes estructuras parasitarias en la luz de las criptas intestinales (H&E Obj. 4X).

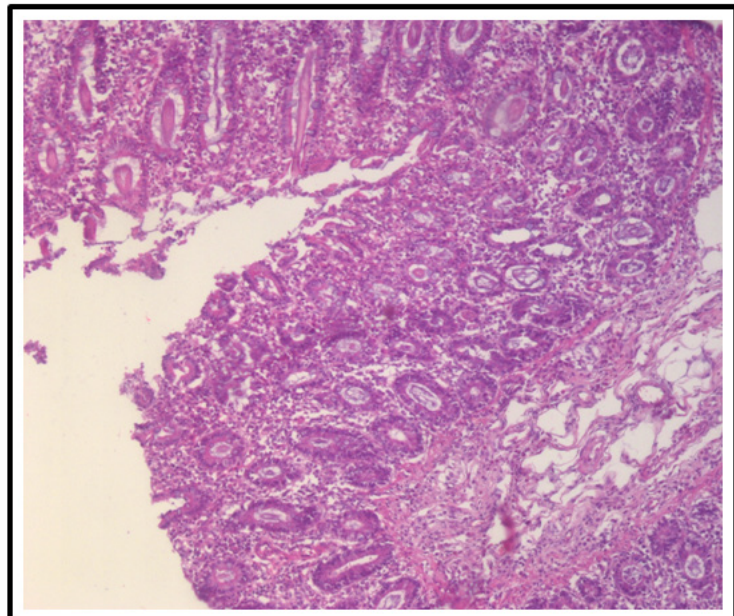
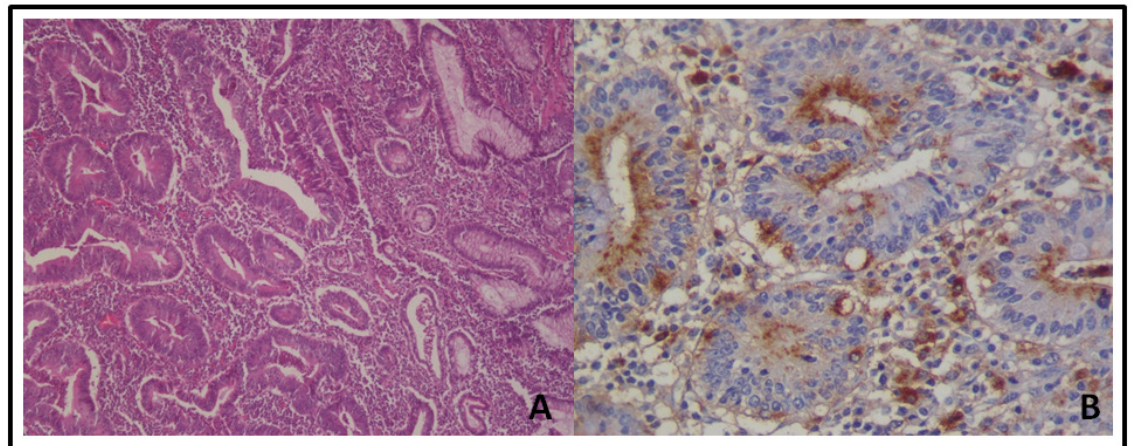


Imagen 5.A. Criptas ramificadas y tapizadas por múltiples células epiteliales inmaduras. A la derecha, con células caliciformes con hiperplasia (regeneración) (H&E Obj. 10X). B. Marcada inmunoreactividad de *L. intracellularis* en el borde apical de los enterocitos hiperplásicos y en los macrófagos de la lámina propia. (LSAB. Obj. 40 X).



d. Estudio histoquímico, inmunohistoquímico y PCR

Los resultados obtenidos luego de la aplicación de WS, IHQ y PCR de TEP para los diferentes agentes evaluados, se muestran en la tabla 4. Complementariamente, se indican los resultados de las pruebas estadísticas utilizadas para determinar la relación entre la asociación etiológica y la técnica utilizada. En relación a la inmunomarcación del antígeno de *L. intracellularis*, este fue detectado en macrófagos de la lámina propia y submucosa en 4 casos, mientras que 17 casos presentaron inmunomarcación en los enterocitos inmaduros de la cripta. El resto de los casos presentó inmunomarcación positiva en ambos tipos celulares (imagen 5B). Para PCV-2, la inmunomarcación predominó en células epitelioides, macrófagos y células gigantes de la lámina propia. Se detectaron 17 cerdos positivos a PCV-2 (imagen 3B).

Los resultados de PCR para la detección de *L. intracellularis* y *B. hyodysenteriae* y su relación con las lesiones anatomopatológicas se presentan en la tabla 5. No se observaron diferencias significativas entre el tipo de lesión y la detección de ADN. Todas las

muestras de intestino positivas por PCR a *L. intracellularis* fueron positivas mediante IHQ. Nueve de 16 casos presentaron inmunomarcación abundante, 5/16 marcación moderada y 2/16 marcación leve. Por otro lado, 5/16 evidenciaron marcación en enterocito, 10/16 en enterocito y macrófago y 1/16 en macrófagos de la lámina propia. No hubo asociación entre el patrón, el lugar de inmunomarcación y el resultado de la técnica de PCR para este agente ($p>0,05$).

En el caso del diagnóstico etiológico “infección por *Brachyspira* spp.”, 5/18 PCR positivas a *B. hyodysenteriae* fueron también WS positivos (imagen 1B). No se observó relación estadísticamente significativa ($p>0,05$) entre la detección mediante PCR y la tinción de WS. Asimismo, tampoco se encontró relación ($p>0,05$) entre la cantidad de espiroquetas visualizadas por WS y el resultado de PCR.

e. Diagnóstico etiológico

Mediante la aplicación de los métodos tradicionales y los moleculares ya referidos, se re-categorizaron 9 casos (tabla 6, indicados en negrita), 4 clasificados inicialmente como enteritis inespecíficas, 3 con lesiones compatibles con infección con *Brachyspira* spp., 1 con lesiones compatibles con infección por *L. intracellularis* y 1 con lesiones compatibles con infección por *Salmonella* spp.

Se observó relación estadísticamente significativa entre la asociación etiológica, establecida sobre la base de las lesiones histopatológicas, y el diagnóstico etiológico ($p<0,05$).

Tabla 3. Asociación estadística entre el tipo de lesión en cada una de las estructuras histológicas y la detección del agente etiológico.

Estructura histológica	Tipo de lesión	Agente etiológico	Valor de p	Valor de Lambda
Célula caliciforme	Ausencia	<i>L. Intracellularis</i>	0,001	0,53
	Hiperplasia	<i>Brachyspira</i> spp.		
	Necrosis	<i>Salmonella</i> spp.		
	Sin cambios	Infección por PCV-2		
Enterocito de la cripta	Hiperplasia	<i>L. Intracellularis</i>	0,001	0,45
	Necrosis	<i>Salmonella</i> spp. <i>Brachyspira</i> spp.		
	Sin cambios	Inespecíficas		
		Infección por PCV-2		
Contenido en la luz de la cripta	Detritus	<i>L. Intracellularis</i>	0,001	0,36
	Mucus	Inespecíficas		
		<i>Brachyspira</i> spp.		
	Sin contenido	Infección por PCV2 <i>Salmonella</i> spp.		
	Parásitos	<i>T. suis</i>		
Infección mixta				
Placas de Peyer	Granulomatoso	Infección por PCV-2	0,001	0,26
	Hiperplasia Reactiva	<i>Salmonella</i> spp.		
	Necrosis	<i>Salmonella</i> spp.		
Cambio vascular	Intenso	<i>Salmonella</i> spp.	0,001	0,1
	Leve	<i>Brachyspira</i> spp.		
Infiltrado celular	Mononuclear	Infección mixta	0,001	0,09
	Mono y polimorfo nuclear	<i>Salmonella</i> spp.		
	Granulomatoso	Infección por PCV-2		
	Sin infiltrado	<i>L. Intracellularis</i>		
Enterocito de la vellosidad	Necrosis difusa, profunda	<i>Salmonella</i> spp.	0,001	0,31
	Necrosis difusa, superficial	Inespecíficas		
		<i>Brachyspira</i> spp.		
	Necrosis focal, profunda	Infección mixta		
		<i>Salmonella</i> spp.		
Sin Necrosis	<i>L. Intracellularis</i>			
	Infección por PCV2			

Tabla 4: Identificación de agentes enteropatógenos mediante PCR, IHQ y WS en cortes de intestino de cerdos de crecimiento y terminación.

Lesiones compatibles con:	Técnica utilizada											
	PCR						IHQ				WS	
	<i>B. hyodysenteriae</i>		<i>B. pilosicoli</i>		<i>L. intracellularis</i>		<i>L. intracellularis</i>		PCV-2		<i>Brachyspira</i> spp.	
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
<i>Brachyspira</i> spp. (IG=16; n=16)	10	6	16	0	-	-	-	-	-	-	4	12
<i>Salmonella</i> spp. (ID= 14; IG=9; n=23)	8	1	9	0	-	-	-	-	-	-	9	0
Infección mixta (ID= 2; IG=4.; n=6)	3	1	4	0	2	0	0	2	0	2	1	3
<i>T. suis</i> (IG=1; n=1)	1	0	1	0	-	-	-	-	-	-	1	0
Enteritis inespecíficas (ID= 6; IG= 5; n=11)	1	4	5	0	1	0	6	0	2	0	5	0
<i>L. intracellularis</i> (ID=41; n=41)	-	-	-	-	25	16	1	40	11	0	-	-
PCV-2 (ID=17; ID-IG=1; n=18)	1	-	1	-	-	-	-	-	0	18	1	-
Valor de p	0,24		s/a		0,45		0,001*		0,001*		0,01*	
Valor de Lambda	0,25				0		0,92		0,98		0,67	

PCR=reacción en cadena de la polimerasa; IHQ= inmunohistoquímica; s/a= sin análisis (análisis no realizable).

*indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). (-) no realizado. ID: intestino delgado; IG: intestino grueso.

Tabla 5. Frecuencia de presentación de los distintos patrones de lesión compatible con infección por *L. intracellularis* y *B. hyodysenteriae* en relación con el resultado de PCR.

Agente infeccioso compatible	Patrón de lesión	PCR positivas/total
<i>L. intracellularis</i>	Adenomatosis intestinal G1	1 / 4
<i>L. intracellularis</i>	Enteropatía hemorrágica	0 / 4
<i>L. intracellularis</i>	Enteritis necrótica	4 / 6
<i>L. intracellularis</i>	Adenomatosis intestinal G2	4 / 9
<i>L. intracellularis</i>	Adenomatosis intestinal G3	7 / 18
<i>B. hyodysenteriae</i>	Colitis catarral	1 / 2
<i>B. hyodysenteriae</i>	Colitis fibrinonecrótica profunda	2 / 3
<i>B. hyodysenteriae</i>	Colitis fibrinonecrótica superficial	8 / 13

G1=grado 1; G2= grado 2; G3= grado 3

Tabla 6. Relación estadística entre la asociación etiológica propuesta sobre la base de las lesiones intestinales y el diagnóstico etiológico obtenido mediante técnicas complementarias.

Asociación etiológica histopatológica	Diagnóstico Etiológico						
	Enteritis inespecíficas (n=12)	<i>L. intracellularis</i> (n=40)	Infección mixta (n=6)	PCV-2 (n=18)	<i>Brachyspira</i> spp. (n=18)	<i>Salmonella</i> spp. (n=22)	<i>T. suis</i> (n=1)
<i>Brachyspira</i> spp. (n=16)	3*	0	0	0	13*	0	0
<i>Salmonella</i> spp. (n=23)	0	0	0	0	1	22*	0
<i>L. intracellularis</i> (n=41)	1	40*	0	0	0	0	0
Infección mixta (n=6)	0	0	6*	0	0	0	0
PCV-2 (n=18)	0	0	0	18*	0	0	0
<i>T. suis</i> (n=1)	0	0	0	0	0	0	1*
Enteritis inespecíficas (n=12)	8*	0	0	0	4	0	0

*indican asociación estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Valor de lambda=0,8831; Valor de $p=0,0001$. Los números en negrita resaltan el cambio de categoría luego de la aplicación de métodos complementarios de diagnóstico.

iii. Discusión

En general, en la bibliografía consultada, son escasos los estudios que relacionan a los agentes infecciosos entéricos en cerdos de engorde con las lesiones microscópicas intestinales. En el presente estudio, se evaluaron histológicamente 117 casos de cerdos de crecimiento y terminación, ingresados durante 12 años al Laboratorio de Patología Especial y que presentaban alguna lesión intestinal. Este número representó el 9,8 % de los casos totales correspondientes a la especie porcina remitidos al laboratorio en el periodo mencionado, lo que demuestra la importancia de los cuadros entéricos en esta categoría y coincide con lo descrito en otros países (Jacobson y col., 2003). La asociación etiológica más frecuentemente observada fue la infección por *L. intracellularis*, seguido de *Salmonella* spp., PCV-2 y *Brachyspira* spp. Las lesiones asociadas a *Trichuris suis* presentaron baja frecuencia; mientras que se observó solo un caso con lesiones de “falso ribete en cepillo” compatible con infección por *B. pilosicoli*. La frecuencia de detección agentes entéricos concuerda con otros estudios realizados a partir de materia fecal en animales vivos (Stege y col., 2000; Baccaro y col., 2003; Suh y Song, 2005; Viott y col., 2013; Dors y col., 2015). En este sentido, los resultados del estudio histopatológico, podrían estar reflejando lo que ocurre en los animales vivos. Asimismo, la similitud observada entre la frecuencia de detección de los agentes en las granjas y en el material proveniente de necropsias, puede obedecer al hecho que, en general, la toma de muestras para diagnóstico anatomopatológico se realiza a partir de cerdos muertos con lesiones entéricas o de cerdos con signos clínicos elegidos para el sacrificio (Quiroga, 2013). Los estudios de laboratorio a partir de animales muertos resultan altamente específicos y permiten detectar enfermedades brindando la posibilidad de evaluar el grado en que cada agente contribuye al desarrollo de la lesión (Perfumo, 2003). Pero, como contraparte, puede decirse que resultan poco sensibles al ser examinados sólo escaso número de animales (Duhamel y Mathiesen, 1999; Stevenson, 2001). En nuestro estudio, solo en un reducido número de casos, no fue posible

adjudicar las lesiones microscópicas a algún agente en particular, lo que demuestra la utilidad de este método diagnóstico. Particularmente, la evaluación histopatológica brinda mejores y más precisos resultados dependiendo de la correcta selección del área a evaluar, la localización, gravedad y extensión de las lesiones macroscópicas (Stevenson, 2001). Por estas razones, a la hora de realizar estudios complementarios, la elección correcta de los cerdos y la obtención y acondicionamiento adecuado de las muestras, resulta fundamental para la una mejor aproximación diagnóstica.

Las infecciones mixtas se observaron en 6 de 117 casos (5 %), en concordancia con otros estudios que presentaron un bajo a moderado porcentaje de las mismas (2 a 13,1 %) (Suh y Song, 2005; Viott y col., 2013; Dors y col., 2015). El agente más frecuentemente involucrado en los casos de infecciones mixtas fue PCV-2 (3/6 casos). Los estudios sobre este virus no han permitido determinar si su presencia junto a otros patógenos es resultado de una coinfección accidental o si realmente la infección por PCV-2 favorece la infección bacteriana (Opriessing y Halbur, 2012). Otras asociaciones observadas en nuestro trabajo fueron *L. intracellularis* con *Salmonella* spp., *B. hyodysenteriae* con *Salmonella* spp., y *Trichuris suis* con *B. hyodysenteriae*, infecciones mixtas también previamente reportadas (Baccaro y col., 2003; Suh y Song, 2005; Pittman y col., 2010; Viott y col., 2013). En este sentido, otros autores han demostrado que no existe una tendencia particular de asociación entre agentes bacterianos, siendo igual de probable cualquier combinación (Møller y col., 1998; Stege y col., 2000). A diferencia de esto, se demostró que la infestación con *Trichuris suis* actúa sinérgicamente con *Campylobacter jejuni*, *B. hyodysenteriae* y otros patógenos entéricos causando colitis mucohemorrágica en cerdos. La hipótesis de esta sinergia se basa en la destrucción de los enterocitos de la mucosa colónica por las larvas parasitarias y/o en la capacidad de *T. suis* para deprimir o modificar la inmunidad de la mucosa, favoreciendo la colonización bacteriana posterior (Pittman y col., 2010). Aun cuando las co-

infecciones estén presentes en un bajo número, su importancia radica en que puede hacer más difícil el diagnóstico y como consecuencia llevar a fallas de los tratamientos clínicos instaurados (Baccaro y col., 2003; Biksi y col., 2007).

En relación a los componentes tisulares y al tipo de lesión evaluada, los valores de Lambda nos permitieron identificar cuáles son las estructuras a las que se les debe prestar especial atención al momento de evaluar las lesiones intestinales. En este sentido, a la hora de establecer un diagnóstico histopatológico se puede orientar hacia un agente etiológico específico, hecho muchas veces solicitado a los laboratorios de patología. Las células caliciformes y los enterocitos de las criptas fueron los componentes intestinales con niveles de Lambda más altos. Existe una reducción del error del 53 % y del 43 % cuando las lesiones observadas en estas células se utilizan para predecir el diagnóstico etiológico de cuadros entéricos en cerdos de crecimiento y terminación. Es por ello, que la evaluación microscópica de las células caliciformes resultó fundamental a la hora de realizar el diagnóstico histopatológico de las entidades que causan colitis, tales como *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* y *T. suis* (Hampson, 2012). En relación a los enterocitos de las criptas, *L. intracellularis* causa hiperplasia de estas células, lo que caracteriza la lesión (Lawson y Gebhart, 2000). En contraste, *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Choleraesuis causan necrosis profunda afectando las criptas y PCV-2 generalmente no se asocia con ningún cambio en el epitelio de las criptas (Reed y col., 1986; Segalés, 2004). Un valor más bajo (36 %) de Lambda se obtuvo para la presencia de contenidos en la luz de las criptas, posiblemente porque estas lesiones son más inespecíficas y pueden ser ocasionadas por más de un agente etiológico. Sin embargo se observó relación estadísticamente significativa entre la presencia de mucus y detritus celulares con la infección por *Brachyspira* spp. y *L. intracellularis*, respectivamente, por lo tanto, sumada a otras lesiones, pueden ser de utilidad para la aproximación diagnóstica. La profundidad y la

extensión de la necrosis de la vellosidad intestinal obtuvieron un valor de lambda del 31 %. Estas lesiones deberían tenerse en cuenta al momento de la asociación etiológica, principalmente considerando que *Salmonella* spp. y *B. hyodysenteriae* / *B. pilosicoli* causan necrosis profunda y necrosis superficial y difusa, respectivamente (Barcellos y col., 2000). En contraposición, generalmente, *L. intracellularis* y PCV-2 generalmente no causan necrosis. Por otro lado, se observó asociación estadística entre la lesión vascular intensa y el diagnóstico etiológico de *Salmonella* spp. En la salmonelosis se observa trombosis de los vasos de la lámina propia y submucosa, lo que explica la necrosis isquémica profunda del tejido (Reed y col., 1986; Carlson y col., 2012). En este trabajo, las lesiones estadísticamente significativas asociadas a infección por *Brachyspira* spp. fueron necrosis superficial y difusa, hiperplasia de las células caliciformes, mucus en la luz de las criptas y cambio vascular leve en la lámina propia. El infiltrado celular de tipo granulomatoso en placas de Peyer, en lámina propia de la mucosa y en submucosa, tuvo una relación estadística con la infección por PCV-2 y el valor de lambda para la respuesta observada en las placas de Peyer fue del 26 %. Las enteritis inespecíficas presentaron asociación estadística con la presencia de mucus y erosión superficial de la mucosa. Ciertas dietas pueden causar acidosis colónica y producir colitis erosivas asociada a su reformulación o a cambios bruscos que contribuyen al desarrollo de lesiones inespecíficas sin relación con agentes infecciosos (Stevenson, 2001).

Lawsonia intracellularis se identificó en casos con distintos patrones de lesión, siendo la presentación más frecuente la crónica, y dentro de ella la adenomatosis de grado 3. El predominio de la presentación de AI sobre las otras formas podría relacionarse con la categoría de los animales afectados; mientras que la frecuencia de ocurrencia de lesiones grado 3, indicativo de intensidad de lesión, acompaña el curso crónico de la enfermedad (Lawson y Gebhart, 2000). Es probable entonces, que el número elevado de casos de AI

grado 3 también esté relacionado a que estos animales son hallados muertos o son los seleccionados para sacrificio y el posterior envío de muestras para estudios complementarios. En algunos casos de AI grados 1 y 2 se observaron grupos de criptas con hiperplasia de células caliciformes ubicadas entre criptas aisladas con hiperplasia de los enterocitos. En estos casos, la presencia de *L. intracellularis* en escasas células epiteliales, la hiperplasia de células caliciformes y la infiltración predominantemente mononuclear en lámina propia y submucosa sugieren que la infección se encuentra en etapa de recuperación y eliminación del agente (Jensen y col., 1997). Otro cambio observado que podría relacionarse con la recuperación, es la restauración epitelial por división celular en las criptas, ya sin cambios proliferativos. Si bien se desconoce la evolución clínica de los animales incluidos en este trabajo todas estas observaciones, en combinación con la inmunomarcación de enterocitos de las criptas afectadas y de macrófagos de la lámina propia, podrían interpretarse como correspondientes a estadios finales de la enfermedad (McOrist y col., 1996; Jensen y col., 1997; Jensen y col., 2006).

La ausencia de respuesta inflamatoria en la lámina propia ($p < 0,05$) se asoció con la infección por *L. intracellularis*. Sin embargo, una respuesta inflamatoria granulomatosa se observó en 11/41 casos, de los cuales 4 también presentaron una leve hiperplasia de células caliciformes. Trabajos previos han relacionado la ocurrencia de lesiones granulomatosas con la presencia de *L. intracellularis* en la lámina propia, placas de Peyer y linfonódulos mesentéricos (Segalés, 2001; Machuca y col., 2012). Se considera que la inflamación granulomatosa es un tipo de respuesta inflamatoria crónica posible de ser observada en la infección por *L. intracellularis*, pero es una reacción variable y que puede depender de las diferencias específicas del huésped (incluyendo la edad del animal y la etapa de la enfermedad) (Vanucci y col., 2014). La respuesta granulomatosa se postuló como un patrón más dentro del complejo EPP (Segalés y col., 2001; Machuca y col., 2012).

Macroscópicamente, las lesiones de EPP granulomatosa pueden ser indistinguibles de la enteritis por PCV-2, ya que ambas causan engrosamiento de la mucosa del íleon. La histopatología, IHQ y PCR de tejidos frescos resultan entonces importantes en su diferenciación (Jensen y col., 2006; Machuca y col., 2008).

Considerando los resultados de IHQ, *L. intracellularis* fue positiva en 40/41 animales con lesiones compatibles con EPP, mientras que PCV-2 se detectó en todos los intestinos con lesión compatible con infección por PCV-2 (18/18). Se observó relación estadísticamente significativa entre la “asociación etiológica” y la detección de *L. intracellularis* y PCV-2 por IHQ, con un valor de Lambda de 92 % y 98 % respectivamente, indicando la reducción en el error cuando la “asociación etiológica” se utiliza para predecir el resultado de la IHQ. Coincidiendo con otros autores, la técnica de IHQ es la mejor herramienta diagnóstica para muestras fijadas en formol y para la realización de estudios retrospectivos ya que presenta una elevada sensibilidad (Ladinig y col., 2009; Weissenbock y col., 2005). Los altos valores de Lambda entre las lesiones y la detección del agente por IHQ demuestran que la histopatología es un método diagnóstico confiable para una correcta presunción etiológica de los cuadros entéricos en cerdos de engorde. En estos casos, en presencia de un conjunto de lesiones características, la probabilidad de que el resultado de IHQ sea positivo es muy elevada.

En relación a la técnica de WS, se observó relación estadística ($p > 0,05$) entre la “asociación etiológica” y el resultado de WS con un valor de Lambda de 67 %. Sin embargo este porcentaje sugiere que en casi 1/3 de los cerdos con lesiones intestinales compatibles con *Brachyspira* spp. no se evidencian las espiroquetas. La técnica de WS posee algunas limitaciones sobre todo en tejidos con avanzada autólisis e invasión bacteriana *post mortem* o con necrosis, además de no ser una tinción específica para una especie o género bacteriano en particular (Jensen y col., 1997; Ladinig y col., 2009). El bajo número de

bacterias en los estadios iniciales o crónicos reduce la posibilidad de marcación positiva con la técnica de WS (Jensen y col., 2000; Weissenbock y col., 2005). Por lo tanto, resultan preferibles métodos más específicos tales como HIS (Jensen y col., 2000), IHQ (White y col., 1998) o PCR de fragmentos cortos (Weissenbock y col., 2005). Además, la HIS y la PCR permiten diferenciar entre las especies de *Brachyspira* spp. tanto patógenas como no patógenas (Jensen y col., 2000).

Cuatro casos de enteritis inespecíficas fueron positivos a *B. hyodysenteriae* por PCR y negativos por WS, indicando que las lesiones no resultaron lo suficientemente claras al momento del examen microscópico y que tampoco se observaron espiroquetas. Cuando las lesiones son inespecíficas, o más sutiles, la posibilidad de establecer una asociación etiológica resulta más dificultosa, pudiendo arrojar falsos resultados. En el mismo sentido, se ha consignado que la evaluación de tejidos con lesiones crónicas puede ser engañosa al igual que aquellos con cambios *post mortem* avanzados (Schwartz, 2004). Por otro lado, 3 casos con lesiones compatibles con infección por *Brachyspira* spp., se re-categorizaron como enteritis inespecíficas ya que resultaron negativos a WS y/o PCR. En estos casos, puede que otros agentes infecciosos o no infecciosos produzcan lesiones similares a *B. hyodysenteriae* (Johnston y col., 2000) o que el método de fijación perjudique la sensibilidad de la PCR de TEP. Es por ello, que para el diagnóstico histopatológico de *Brachyspira* spp. en tejidos fijados, en ausencia de HIS o IHQ, se sugiere el uso conjunto de la técnica de WS y PCR de TEP ya que el uso de ambas técnicas en paralelo mejorarían la sensibilidad diagnóstica de la histopatológica (Jensen y col., 2000).

En relación a técnica de PCR a partir de TEP, se detectaron genes de *B. hyodysenteriae* y *L. intracellularis* en el 66 y 40 % respectivamente, de los casos con diagnóstico etiológico. Un estudio comparativo de métodos diagnósticos, determinó una alta especificidad, pero baja sensibilidad (41 %) a partir de TEP para *L. intracellularis* (Ladinig y

col., 2009). Solo se observó un caso con lesiones de “falso ribete en cepillo” compatible con infección por *B. pilosicoli* aunque no pudo confirmarse mediante PCR. La PCR a partir de TEP posee mediana a baja sensibilidad por múltiples factores que afectan la calidad del ADN, tales como el agente fijador (naturaleza, concentración, pH, temperatura), tipo y tiempo de almacenamiento previos al parafinado y el método de extracción y purificación (Bustamante y col., 2011). El tamaño de la molécula a amplificar es otro de los factores limitantes (Ladinig y col., 2009). En los tejidos fijados se producen fragmentación y degradación del ADN, además de enlaces cruzados entre las proteínas y el ADN. Estos problemas asociados a la fijación dificultan la amplificación posterior por PCR (Weissenbock y col., 2005). En nuestro estudio, no se tiene registro de cantidad de horas o de metodología de fijación de las muestras. Para mejorar la sensibilidad, se utilizó un *kit* específico para muestras provenientes de TEP y los segmentos a amplificar fueron de hasta 320 pares de bases. Aun habiendo tomado estas precauciones, no se detectó relación ($p>0,05$) entre la “asociación etiológica” y los resultados de la PCR para todos los agentes (tabla 4). Tampoco hubo asociación estadística entre la localización de las bacterias y la detección por PCR. Sin embargo, los casos positivos por PCR fueron más frecuentes cuando las marcaciones inmunohistoquímicas o histoquímicas resultaron más evidentes y con lesiones más típicas (tabla 5), lo que sugiere que la ausencia de asociación podría estar relacionada con la degradación del ADN durante la fijación, parafinado y desparafinado de las muestras, o también podría ser consecuencia del bajo número de muestras evaluado (Ladinig y col., 2009). Si bien la calidad y cantidad de ADN extraído fueron óptimos (datos no presentados), estos valores resultaron más bajos en muestras que provenían de tacos parafinados de mayor antigüedad, lo que insinúa un efecto del tiempo de almacenamiento en el proceso de conservación del ADN.

iv. Conclusiones

1. Más del 70 % de los casos recibidos durante el período evaluado, se asociaron a *L. intracellularis*, *Brachyspira* spp. y *Salmonella* spp.
2. *Lawsonia intracellularis* fue la bacteria más frecuentemente identificada en cortes de intestinos, siendo la presentación más frecuente la AI grado 3.
3. Si bien, PCV-2 fue la primera causa de enteritis granulomatosa, *L. intracellularis* también se detectó en ese tipo de lesiones. Debemos considerar a dicha bacteria dentro de los diagnósticos diferenciales de enteritis granulomatosa. Desde el punto de vista morfológico, su diferenciación se basa en la hiperplasia de los enterocitos, solamente observada en los casos de EPP.
4. Los cambios histológicos de mayor relevancia para el diagnóstico etiológico se observaron en las células caliciformes, en los enterocitos de las criptas y la profundidad y la extensión de la necrosis de la mucosa intestinal.
5. La histopatología es un método diagnóstico confiable y permite una correcta presunción etiológica, principalmente en los casos de *L. intracellularis* y PCV-2, ya que se observó relación estadísticamente significativa entre la “asociación etiológica” y la detección por IHQ.
6. Cuando las lesiones son inespecíficas o más sutiles, la asociación etiológica realizada a partir de la evaluación histopatológica resulta más difícil y es necesaria la implementación de otros métodos de diagnósticos.
7. En un tercio de los cerdos con lesiones intestinales compatibles con *Brachyspira* spp. no se pudieron identificar espiroquetas con la tinción de WS.

8. En los estudios retrospectivos, en ausencia de HIS o IHQ, se sugiere el uso conjunto de la histopatología, de la técnica de WS y de PCR de TEP para lesiones compatibles con infección por *Brachyspira* spp.
9. La técnica de PCR a partir de TEP posee mediana a baja sensibilidad. Sin embargo se propone como complemento a la evaluación histológica con la posibilidad de recuperar ADN de material de archivo.

4. Capítulo 2: Estudio prospectivo en 8 granjas de cerdos.

Objetivos específicos

- ❖ Evaluar la tasa de excreción de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella* spp. en cerdos de crecimiento y terminación, con y sin manifestación clínica de diarrea.
- ❖ Evaluar la relación entre la detección en materia fecal de los agentes patógenos mencionados y el desarrollo de cuadros de diarrea.
- ❖ Evaluar la detección de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y aislamiento de *Salmonella* spp. en tejidos y el desarrollo de lesiones intestinales.
- ❖ Determinar la interacción entre los agentes infecciosos mencionados.

i. Materiales y métodos

Análisis transversal en 8 granjas porcinas confinadas

a. Selección de las granjas

Entre los meses de julio de 2013 y agosto de 2014 se evaluaron 8 granjas porcinas intensivas de ciclo completo (nacimiento a venta). Los establecimientos se localizaban en las provincias de La Pampa (1), Buenos Aires (4), Córdoba (1), Entre Ríos (1) y Santa Fe (1).

La selección de los establecimientos se realizó sobre la base de la aceptación, por parte del personal de la granja, de brindar información al momento de la visita y de la

posibilidad, por parte del personal involucrado en el estudio, de visitar el establecimiento para recolectar muestras y realizar necropsias.

b. Obtención de los datos

En cada establecimiento, se recogieron datos epidemiológicos, productivos y sanitarios mediante una planilla *ad-hoc* (planilla 1 en anexo). Las planillas se completaron mediante entrevistas personales, con el productor y/o su asesor veterinario e incluyeron preguntas de tipo cerradas o semi-cerradas. Se tuvo en cuenta el número de madres, tipo de granja, normas de bioseguridad, limpieza y control de plagas, plan alimentario, instalaciones y plan sanitario. También, se obtuvieron parámetros productivos tales como peso y edad al destete, recría y venta; ganancia diaria de peso (GDP) y porcentajes de mortalidad en cada una de las etapas (anexo, planillas 1 y 2).

c. Evaluación clínica

Se realizó el examen clínico grupal a los cerdos de 8, 11, 14, 17, 20 y 24 semanas de vida. Se obtuvo el porcentaje de animales con diarrea por edad.

d. Diseño experimental

Se obtuvieron 10 muestras de materia fecal de animales sin diarrea y 10 muestras de animales con diarrea pertenecientes a los grupos examinados clínicamente. La materia fecal se recogió del recto o del piso cuando se detectaba que los animales defecaban al momento de la inspección. De cada animal, se colectaron aproximadamente 25 gramos de materia fecal y se colocaron en bolsas plásticas individuales. El número de muestras se estableció con el objeto de identificar al menos un animal positivo para cualquiera de las entidades estudiadas, considerando una prevalencia estimada del 20% y un nivel de confianza del

95%. Dicha prevalencia se calculó a partir de estudios previos en Argentina y de la bibliografía consultada (Stege y col., 2000; Baccaro y col., 2003; Machuca y col., 2009).

A cada muestra, se le asignó un rótulo y en una planilla se registraron las características de la materia fecal. Se realizó una clasificación en grados sobre la base de la consistencia y la presencia/ausencia de sangre. Sin diarrea: grado 0= consistencia normal con forma. Con diarrea: grado 1= consistencia semi-sólida sin sangre; grado 2= materia fecal acuosa sin sangre; grado 3= heces blandas o formes con sangre fresca; grado 4= heces líquidas con sangre digerida (imagen 6) (Winkelman, 1997). Además se consideraron el color (rojo negruzco; rojizo; amarillo verdoso; amarillo; gris y verdoso) y el contenido (mucus; mucus y sangre; sangre fresca; sangre digerida; material necrótico; alimento sin digerir; y sin contenidos anormales).

Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su remisión al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria “Dr. Bernardo Epstein”.

e. Necropsias y obtención de muestras de animales hallados muertos

Se realizó la necropsia de los animales hallados muertos de las categorías en estudio. Se obtuvieron muestras para estudio histopatológico las que se fijaron en formol neutro al 10%. Asimismo, se extrajo un segmento intestinal de 10 cm de largo y se colectó contenido colónico para estudios de PCR y aislamiento de *Salmonella* spp. Estas muestras se colocaron en recipientes plásticos estériles y se refrigeraron a 4 °C hasta su arribo al laboratorio.

Imagen 6. Categorización de la materia fecal en cerdos de crecimiento y terminación. A grado 1= consistencia semi-sólida sin sangre; B grado 2= materia fecal acuosa sin sangre; C grado 3= heces blandas o formes con sangre fresca; D grado 4= heces líquidas con sangre digerida.



De manera similar a lo realizado durante el estudio retrospectivo, en cada caso se estableció un diagnóstico etiológico sobre la base de los resultados del estudio histopatológico y de las técnicas complementarias de IHQ, WS y/o PCR.

f. Estudios moleculares

*Preparación de las muestras y elaboración del ADN molde:

- Materia fecal y contenido intestinal: la extracción y purificación de ADN se realizó a partir de la materia fecal de los animales vivos y del contenido colónico de los animales muertos. Para la extracción de ADN se utilizó ZR Fecal DNA MiniPrep. (ZymoResearch, California, EE.UU.) y se procedió según las indicaciones del fabricante.

- Mucosa intestinal: el segmento intestinal extraído en la necropsia, se cortó en sentido longitudinal utilizando tijera y pinza estériles, e inmediatamente se lavó con solución fisiológica estéril hasta remover todo el contenido intestinal visible. Con un bisturí estéril, se raspó un área de 3 cm y el material obtenido se colocó dentro de un tubo tipo Eppendorf (Ladinig y col., 2009). Para la extracción del ADN se utilizó el kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

En la imagen 7 se muestra como se realizó el raspado de la mucosa y el pesaje del material obtenido y de la materia fecal previo al inicio del proceso de extracción del ADN. En la imagen 8 se observa el ADN molde (ya extraído) en un tubo tipo Eppendorf.

Técnica de PCR múltiple: para la identificación específica de los genes de *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* se realizó la técnica de PCR múltiple utilizando los cebadores adecuados para cada agente (La y col., 2006). En la tabla 7 se indican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la detección de cada gen y el tamaño de los productos amplificados. La mezcla PCR, en un volumen final de 25 μ l por reacción, consistió en *buffer* PCR (conteniendo 1,5 mmol/L⁻¹ de MgCl₂), 1,25 UI de Maxima Taq Hot Start DNA Polimerasa (Fermentas, EE.UU.), 0,1 mmol L⁻¹ μ l de cada dNTP (Invitrogen, California, EE.UU.), 0,2 mmol L⁻¹ de cada oligonucleótido (H1 y H2, P1 y P2, Lint-146F y Lint-745R) (Invitrogen, California, EE.UU.) y 2,5 μ l de ADN molde.

Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C por 15 minutos para la activación de la polimerasa, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 58 °C durante 90 segundos y 68 °C por 2 minutos. Por último, se realizó un ciclo final de 10 minutos a 68 °C a fin de asegurar la extensión completa de los productos amplificados. La visualización se realizó sembrando los productos en un gel de agarosa al 1,5 % en TAE y la corrida electroforética se desarrolló durante 40 minutos. Los equipos e insumos fueron los mismos que los utilizados en el trabajo retrospectivo.

Imagen 7. Pesaje de materia fecal y de raspado de mucosa previo a la extracción del ADN.

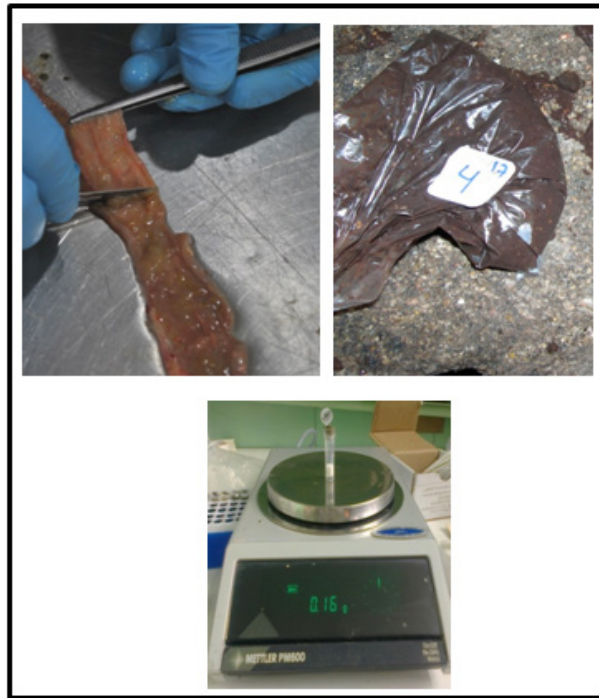


Imagen 8. A. ADN molde extraído mediante kits comercial. B. Visualización de bandas de los genes de *B. hydysenteriae* (BH), *B. pilosicoli* (BP) y *L. intracellularis* (LI), CALLES 1-3. Calles 4 y 5 control negativo. Calle 6 tamaño molecular. Calle 7, detección múltiple de los 3 genes.

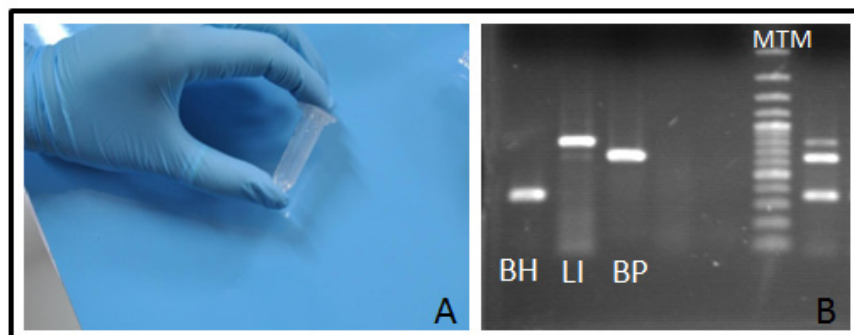


Tabla 7. Cebadores utilizados para la detección de *B. hyodysenteriae*, *L. intracellularis* y *B. pilosicoli*, mediante la técnica de PCR múltiple.

Nombre de la bacteria	Nombre del gen	Producto a amplificar	Cebador	Secuencia 5'-3'	pb
<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>Nox</i>	Región del NADH oxidasa	H1	5'-ACTAAAGATCCTGATGTATTTG-3'	354
<i>B. pilosicoli</i>	<i>16S rRNA</i>	Región de 16S rRNA	H2 P1	5'-CTAATAAACGTCTGCTGC-3' 5'-AGAGGAAAGTTTTTCGCTTC-3'	823
<i>L. intracellularis</i>	<i>16S rRNA</i>	Región de 16S rRNA	P2 Lint-146F Lint-745R	5'-GCACCTATGTTAAACGTCCTTG-3' 5'-GATAATCTACCTTCGAGACGG-3' 5'-TGACCTCAGTGTTCAGTTATCGT-3'	655

g. Estudios bacteriológicos

Para el procesamiento de las muestras de materia fecal provenientes de los animales con y sin diarrea, y con el objetivo de aislar *Salmonella* spp. se realizaron *pools* de 5 animales. Estas muestras junto con las de materia fecal y de contenido colónico obtenido de necropsias, se procesaron en el Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Antimicrobianos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, de acuerdo a lo descrito por Vigo (Vigo y col., 2009). Los aislamientos identificados como *Salmonella* spp. se serotipificaron en el Servicio de Antígenos y Antisueros, Instituto Nacional de Producción de Reactivos y Biológicos-ANLIS "Carlos G. Malbrán" utilizando la técnica de aglutinación con antisueros polivalente y monovalente O y H (Vigo y col., 2006).

h. Definición de cuadro clínico y subclínico:

* cuadro clínico a nivel:

-Animal: detección de uno o más agentes en materia fecal grado 1, 2, 3 o 4 (con diarrea).

-Lote: presencia de uno o más agentes en la materia fecal de los cerdos en un lote donde más del 4% de los cerdos presentó diarrea en la evaluación clínica.

-Granja: detección de uno o más agentes en un establecimiento donde el veterinario a cargo manifestó estar frente a un problema de diarrea en una o más categorías de edad.

*cuadro subclínico a nivel:

-Animal: detección de uno o más agentes en materia fecal grado 0 (sin diarrea).

-Lote: presencia de uno o más agentes en la materia fecal de los cerdos en un lote donde menos del 4 % de los cerdos presentó diarrea en la evaluación clínica.

-Granja: detección de uno o más agentes en un establecimiento donde el veterinario a cargo no manifestó tener un problema de diarrea en una o más categorías de edad.

i. Análisis de los resultados

- Análisis descriptivo: se realizó un análisis descriptivo de:

*las características de los establecimientos.

*la frecuencia de animales positivos a los agentes en estudio y los porcentajes de detección global en cada granja.

*la frecuencia de animales positivos a los patógenos en estudio según la granja, la edad y la ocurrencia de diarrea.

*la frecuencia de animales positivos según el grado de la materia fecal.

*la detección simultánea de los agentes en estudio en animales vivos y hallados muertos.

- Análisis inferencial:

Análisis estadístico a nivel individuo: para evaluar la asociación entre la detección de los agentes patógenos en la materia fecal y la presencia de diarrea se realizó una prueba de Chi-cuadrado. Para evaluar la fuerza de asociación entre dichas variables categóricas, se calculó el Odds Ratio (OR).

Para explicar los factores de riesgo asociados a la presencia de cada uno de los agentes estudiados se utilizó un modelo de regresión logística múltiple. Se incluyeron como predictores categóricos a la granja (1-8), la edad (8, 11, 14, 17, 20, 24 semanas), el grado de materia fecal (0-4) y la coinfección con otro agente evaluado. No se incluyeron en el modelo el contenido y el color de la materia fecal ni el uso de antimicrobianos ya que se encontraban correlacionados con el grado de la materia fecal y la semana de vida de los animales, respectivamente.

Análisis estadístico a nivel de lotes: de cada edad valorada en cada granja, se obtuvo un porcentaje de animales con y sin diarrea positivos a cada agente evaluado. El análisis exploratorio de dichos datos sugirió una posible relación entre el grupo de animales positivos a *L. intracellularis* con diarrea y el grupo de animales positivos a *L. intracellularis* sin diarrea, por lo tanto se realizó una correlación de Spearman para determinar la fuerza y sentido de asociación (positiva o negativa).

ii. Resultados

- **Análisis descriptivo**

- a. Características de los establecimientos**

Se evaluaron 8 granjas intensivas con una mediana de 830 madres (amplitud de 70 a 2500). Cinco granjas eran de un solo sitio de producción, mientras que presentaban 3 sitios de producción la granja 3 (2500 madres) y la granja 8 (1500 madres). La granja 5 tenía 2 sitios. En relación con el flujo de producción, y dentro de las granjas de un solo sitio, las granjas 2 y 4 presentaban dos edades dentro de un mismo galpón de engorde, mientras que la 6 y 7 eran de flujo continuo. Las 3 granjas múltiples sitios o de gran tamaño utilizaban el sistema todo dentro/todo fuera. En relación a la bioseguridad, sólo una granja contaba con lavador de chasis de camiones y cuarentena. En dos granjas el camión de traslado a frigorífico era compartido entre vecinos y el mismo, al momento de la carga tenía contacto directo con los operarios de la granja. Además, en estos dos establecimientos, no había control sobre el ingreso de vehículos externos. En todos los establecimientos se llevaban a cabo planes de control de roedores. La metodología de lavado y desinfección era similar en todas las granjas: lavado con agua fría y uso de soluciones desinfectantes comerciales. Todas las granjas utilizaban algún tipo de antimicrobiano, vía alimento o inyectable, en animales de menos de 20 semanas de vida. La granja 8 aplicaba la vacuna “Enterisol ileitis” vía oral, solamente a las lechonas de reposición propia. Esta vacuna se aplicaba entre los 39 y 49 días de vida.

b. Frecuencia de animales positivos a los agentes en estudio y porcentajes de detección global por granja

En total se procesaron 943 muestras de materia fecal, correspondientes a 449 de cerdos con diarrea y 494 sin diarrea. El patógeno más detectado fue *L. intracellularis* en el 16,22 % de los animales (153 cerdos), seguido por *B. hyodysenteriae* con 1,38 % positivos (13 animales). No se detectaron animales positivos a *B. pilosicoli*. El 82,4 % (777) de las muestras resultaron negativas por PCR. Con respecto a *Salmonella* spp. 6,3 % de los *pooles* (9/144) fueron positivos. En la tabla 8 se presentan los porcentajes de detección global en cada granja y de cada agente.

Tabla 8. Porcentaje y frecuencia absoluta, entre paréntesis, de detección por PCR y aislamiento de agentes bacterianos entéricos en cerdos de crecimiento y terminación en 8 granjas intensivas.

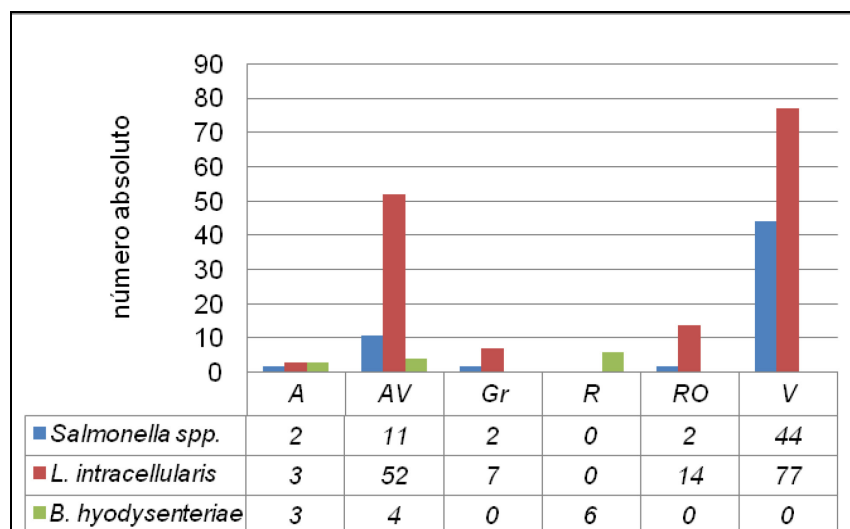
Granja	PCR	PCR	PCR	Pooles positivos <i>Salmonella</i> spp.
	<i>L. intracellularis</i>	<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>	
1	15,9 (20)	0	0	16,7 (2)
2	10,7 (13)	0	0	8,3 (1)
3	7,7 (10)	0	0	0
4	34,7 (42)	0	0	0
5	14,9 (18)	0	0	4,4 (1)
6	14,3 (17)	5,9 (7)	0	0
7	3,7 (3)	7,4 (6)	0	6,3 (1)
8	24,2 (30)	0	0	16 (4)
Total	16,22 (153)	1,38 (13)	0	6,3 (9)

c. Frecuencia de animales positivos a los patógenos en estudio según granja, edad y ocurrencia de diarrea

En todas las granjas y edades evaluadas se encontró al menos un animal con diarrea. El mínimo de diarrea observado fue 0,5 % y el máximo 20,8 %. En las categorías con mayor detección de agentes, los porcentajes de diarrea no fueron los más elevados del estudio y la mayoría de los cerdos presentaron diarrea grado 1 y 2 (420 animales). En el

gráfico 1 se indica la frecuencia de animales positivos a cada agente en relación al color de la materia fecal. Los animales positivos a *L. intracellularis* presentaron, en su mayoría, materia fecal color verdoso y amarillo verdoso. Fue menos frecuente encontrar animales con materia fecal con sangre digerida, pero cuando se observó, el 87 % de las muestras fueron positivas a *L. intracellularis*. Los cerdos positivos a *B. hyodysenteriae* presentaron materia fecal de color rojo brillante, amarillo o amarillo-verdoso, mientras que en los animales positivos a *Salmonella* spp. la materia fecal resultó principalmente verdosa o amarillo-verdosa (imagen 9).

Gráfico 1. Número de cerdos positivos a *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae*, *Salmonella* spp. según el color de la materia fecal.



A=amarillo; AV= amarillo-verdoso; Gr= gris; R= rojizo; RO= rojo negruzco; V=verdoso.

En la tabla 9 se presentan los datos relacionados con la detección y aislamiento de los cuatro patógenos según granja, lote y porcentaje de diarrea por edad. También se indica los serotipos de *Salmonella* spp. aislados en cada *pool* positivo. La cepa encontrada en la granja 8 de *Salmonella* es una variante monofásica de *S. enterica* serovar Typhimurium.

Los veterinarios asesores de las granjas 4, 6, 7 y 8 manifestaron tener problemas de diarrea, por lo tanto fueron categorizadas como granjas con problemas clínicos. La granja 4, al momento del estudio presentaba un cuadro clínico agudo de enteropatía proliferativa porcina y se obtuvieron los siguientes valores de animales positivos a *L. Intracellularis* en relación al grado la materia fecal: grado 0: 42,9 %, grado 1: 19 %, grado 2: 23,8 % y grado 4: 14,3 %. Además, se observaron contenidos anormales en la materia fecal tales como restos de material necrótico. En la granja 8 se obtuvieron los siguientes valores de animales positivos a *L. Intracellularis* en relación al grado la materia fecal: grado 0: 33,3 %, grado 1: 33,3 %, grado 2: 26,7 % y grado 4: 6,7 %. Ambas granjas (4 y 8) se consideraron con presentaciones de EPP clínica sobre la base de los porcentajes de detección de *L. intracellularis*, las características de la materia fecal y el diagnóstico anatomopatológico obtenido en las necropsias.

Las granjas 6 y 7, presentaron un cuadro clínico asociado a *B. hyodysenteriae*, ya que se observó materia fecal con mucus y sangre fresca en 7,4 % y 10,4 % de los animales en cada granja, respectivamente. Además se detectó el agente en la materia fecal y mucosa de los animales que se les realizó necropsia. En la granja 6, los valores de detección de *B. hyodysenteriae* en relación al grado de materia fecal fueron: grado 0: 0 %; grado 1: 57,1 %; grado 2: 28,6 % y grado 3: 14,3 %; y en la granja 7: grado 0: 0 %, grado 2: 16,7 % y grado 3: 83,3 %.

a. Frecuencia de animales positivos según el grado de la materia fecal

En la tabla 10 se presenta la relación entre la detección y el aislamiento de los cuatro patógenos estudiados según los grados de la materia fecal. En la categoría sin diarrea (grado 0) se detectaron animales positivos a *L. intracellularis* y *Salmonella* spp., mientras que en la categoría con diarrea, en los grados 1 y 2 se detectaron *B. hyodysenteriae*, *L.*

intracellularis y *Salmonella* spp. En los grados 3 y 4, 6/15 muestras fueron positivas a *B. hyodysenteriae* y 13/15 resultaron positivas a *L. intracellularis*, respectivamente. En los gráficos 2 y 3 se ilustra la detección semanal de *L. intracellularis* y *Salmonella* spp. en cada granja observándose el marcado aumento de la detección sobre las fases finales del engorde.

Imagen 9. Colores de la materia fecal observados en cerdos de crecimiento y terminación con diarrea. A. Color verdoso; B color amarillo-verdoso; C Amarillo; D Gris; E rojo negruzco; F rojizo

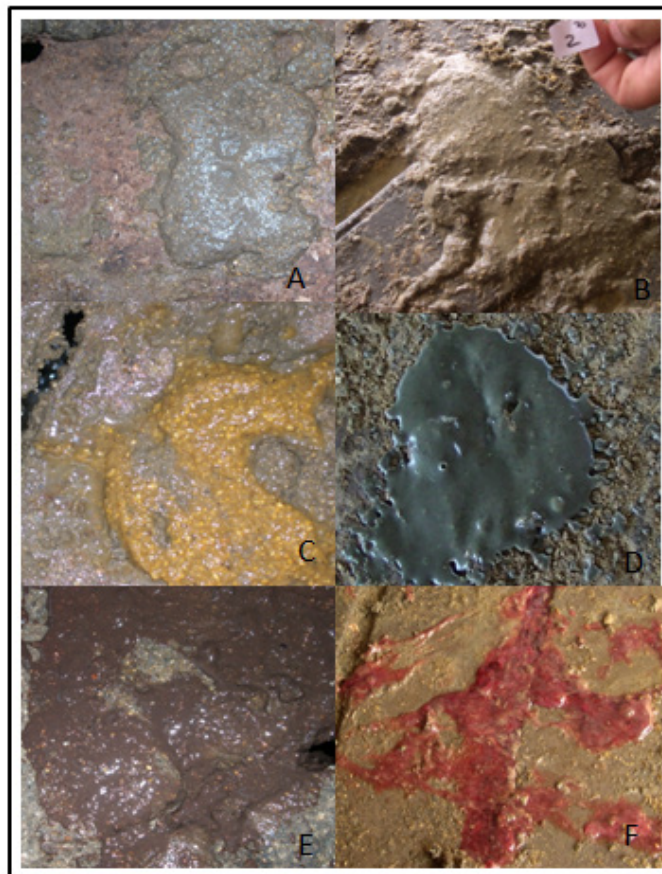


Tabla 9. Detección de agentes mediante técnica de PCR, expresada en porcentaje de animales positivos, y aislamiento de *Salmonella* spp. Los valores se presentan discriminados por granja, edad y presencia o ausencia de diarrea.

Granja	Edad	Diarrea (%)	Detección <i>Li</i>		Detección <i>Bh</i>		Aislamiento de <i>Salmonella</i>	
			c/diarrea	s/diarrea	c/diarrea	s/diarrea	c/diarrea	s/diarrea
1	8	1,9	0	0	0	0	0	0
	11	5,5	0	0	0	0	0	0
	14	4,2	73 ^B	25	0	0	0	0
	17*	1,0	38 ^B	0	0 ^A	0	0	0
	20	3,3	0 ^B	0	0	0	82 ^{Sj}	0
	24	3,6	45 ^B	10	0	0	100 ^{Sj}	0
2	8	0,0	0	0	0	0	0	0
	11	5,3	0	0	0	0	0	0
	14	3,5	20	0	0	0	0	85 st
	17*	20,8	0	0	0	0	0	0
	20	6,5	60	20	0	0	0	0
	24	5,2	40	0	0	0	0	0
3	8	3,7	0	0	0	0	0	0
	11	1,4	0	0	0	0	0	0
	14	3,3	0	0	0	0	0	0
	17	1,1	0	0	0	0	0	0
	20*	0,5	0	0	0	0	0	0
	24	1,0	55 ^B	36	0	0	0	0
4	8	3,0	0	0	0	0	0	0
	11	3,7	0	0	0	0	0	0
	14	3,0	44	18	0	0	0	0
	17	4,4	100 ^B	80	0	0	0	0
	20*	1,4	40 ^B	7	0	0	0	0
	24	1,8	78	64	0	0	0	0
5	8	2,4	27	0	0	0	0	0
	11	2,5	0	0	0	0	0	0
	14	2,0	0	0	0 ^A	0	0	0
	17*	0,9	0	0	0	0	0	0
	20	1,9	33	27	0	0	0	0
	24	2,3	70 ^B	20	0	0	0	55 st
6	8	4,4	0	0	0	0	0	0
	11	5,4	0	0	64 ^A	0	0	0
	14	4,3	0	9	0 ^A	0	0	0
	17	4,6	10	10	0	0	0	0
	20	5,8	78	30	0	0	0	0
	24	6,8	20	27	0	0	0	0
7	8	13,2	0	0	0	0	0	0
	14	11,1	0	0	9 ^A	0	0	0
	17*	7,6	0	0	45 ^A	0	0	55 ^{sd}

	20	6,7	0	27	0 ^A	0	0	0
8	8	2,7	0	0	0	0	0	0
	11	2,5	0	0	0 ^A	0	42 ^{s2}	0
	14	1,4	0	0	0	0	0	0
	17*	1,2	38	7	0	0	0	41 ^{s2}
	20	1,8	71 ^B	60	0	0	71 ^{s2}	0
	24	4,2	88	33	0	0	0	0

Lf *Lawsonia intracellularis*. *BH*: *Brachyspira hyodysenteriae*. ^{s1}Aislamiento de *Salmonella* Javiana; stAislamiento de *Salmonella* Tennessee; ^{sd}Aislamiento de *Salmonella* Derby; ^{s2}Aislamiento de *Salmonella subesp I* 4,12:i:, (monofásica). ^{s1}Aislamiento de *Salmonella subesp I* 3,10:z10:- A: al menos un animal con materia fecal grado 3; B: al menos un animal con materia fecal grado 4; * último uso de antibiótico.

Gráfico 2. Detección semanal de *L. intracellularis* por granja en relación a la semana de vida.

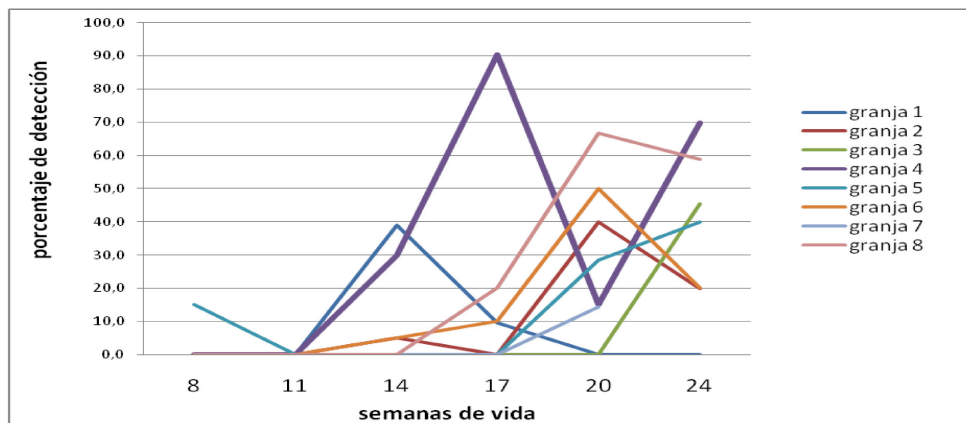


Gráfico 3. Detección semanal de *Salmonella* spp. por granja en relación a la semana de vida.

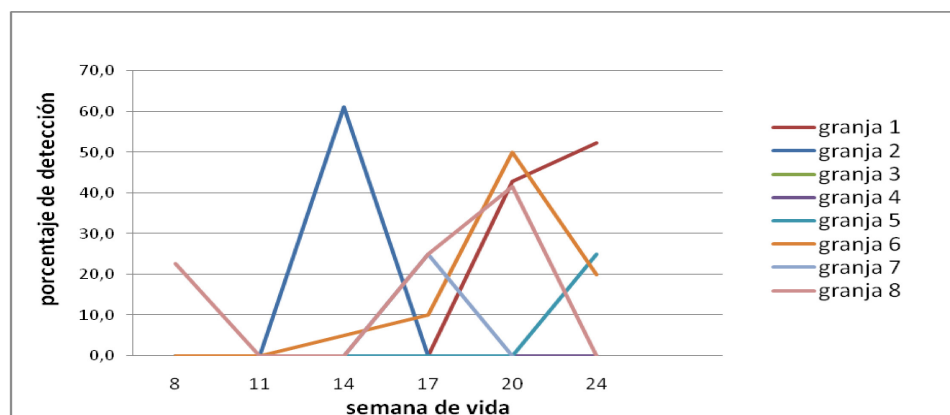


Tabla 10. Frecuencia absoluta y porcentaje de detección de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella* spp. en cerdos con y sin diarrea.

Categoría	Grado	Cantidad de animales (%)	Muestras negativas (%)	Muestras positivas a: (%)			
				<i>L. intracellularis</i>	<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>	<i>Salmonella</i> spp.
SD	0	494 (52,4)	440 (56,6)	54 (35,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	26 (42,6)
CD	1	260 (27,6)	211 (27,2)	45 (29,4)	4 (30,8)	0 (0,0)	22 (36,1)
	2	159 (16,8)	115 (14,8)	41 (26,8)	3 (23,1)	0 (0,0)	11 (18)
	3	15 (1,6)	9 (1,2)	0 (0,0)	6 (46,1)	0 (0,0)	0 (0,0)
	4	15(1,6)	2 (0,2)	13 (8,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,3)
Total		943 (100)	777 (100)	153 (100)	13 (100)	0 (0,0)	61 (100)

SD: sin diarrea; CD: con diarrea.

Tabla 11. Detección de agentes enteropatógenos en animales muertos en cada granja.

Granja	n	<i>L. intracellularis</i>	<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>T. suis</i>	Mixtas
3	5	1	0	1	3 ^{1,2}
4	5	5	0	0	0
6	1	0	1	0	0
7	1	0	0	0	1 ³
8	3	3	0	0	0
Total	15	9	1	1	4

¹Combinación de *Trichuris suis* y *Lawsonia intracellularis*; ²Combinación *Trichuris suis* y PCV-2.
³Combinación *B. hyodysenteriae* y *Lawsonia intracellularis*.

Un total de 4/9 animales con diagnóstico de infección por *L. intracellularis* presentaron diarrea. En relación a las lesiones macroscópicas, 3/9 no evidenciaron lesiones macroscópicas relacionadas a EPP, 2/9 presentaron necrosis de válvula ileocecal y 4/9 engrosamiento de íleon. En relación a las lesiones microscópicas, en 5/9 se identificaron lesiones compatibles con EPP. En el resto de los animales se observaron lesiones inespecíficas. Todas fueron positivas por IHQ o PCR a partir de mucosa. En los animales de la granja 3, en la observación microscópica se identificaron larvas de *T. suis* en las criptas colónicas y lesiones asociadas a PCV-2 con identificación por IHQ. En la imagen 10 se pueden observar algunas de las lesiones encontradas.

- **Análisis estadístico inferencial**

- b. Análisis estadístico a nivel individual**

Se observó asociación estadísticamente significativa entre la detección *L. intracellularis* y la presencia de diarrea. La detección de *L. intracellularis* incrementó el OR de diarrea 2,3 veces (tabla 12). No se observó asociación estadística en relación *Salmonella*.

Los resultados de la regresión logística múltiple se presentan en las tablas 13 y 14. No se pudo realizar el análisis de regresión logística para *B. hyodysenteriae* y *B pilosicoli* debido a la ausencia de animales positivos sin diarrea.

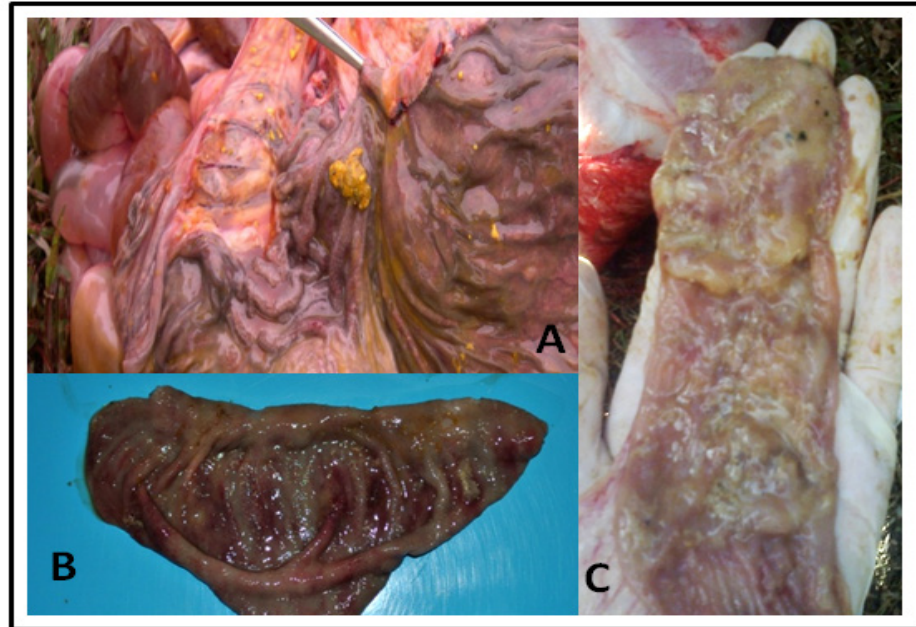
Los animales de las granjas 4, 8, 1, 6, 5 presentaron un incremento en el riesgo de detección de *L. intracellularis* de 14,8; 8,8; 4,5; 4; y 3,7 veces más, en comparación con la granja 7. Las granjas 2 y 3 no presentaron diferencias con respecto a la 7. Los animales de 24, 20, 17 y 14 semanas de vida, presentaron un riesgo de resultar positivos por PCR a *L. intracellularis* de 47,4; 30,8, 12,3 y 7,4 veces mayor que los animales con 8 semanas. Los animales con materia fecal grados 4, 2 y 1 presentaron riesgo de detección de *L. intracellularis* de 32,14; 4,76 y 2,41 veces más elevado que aquellos con materia fecal grado cero. Ningún cerdo en la semana 11 o con materia fecal grado 3 o positivo a *B. hyodysenteriae* resultó positivo a *L. intracellularis*, por el cual el modelo de análisis no fue convergente (tabla 13)

Tabla 12. OR, intervalos de confianza y asociación estadística entre la detección por PCR de *L. intracellularis* y el aislamiento *Salmonella* spp. en materia fecal y la presencia de diarrea.

Variable	OR	95% IC inferior	95 % IC superior	Valor de p
PCR positivo <i>L. intracellularis</i>	2,30	1,6	3,3	0,0001*
Aislamiento <i>Salmonella</i> spp.	1,52	0,9	2,6	0,114

*indican diferencias estadísticamente significativas; nc= no calculado; IC= intervalo de confianza.

Imagen 10. A. Necrosis de válvula ileocecal (PCR positivo *L. intracellularis*) B. Colitis fibrinonecrótica y hemorrágica (PCR positivo a *B. hyodysenteriae*). C. Colitis mucosa (PCR positivo a *B. hyodysenteriae*).



En la tabla 14 se presentan los resultados de la regresión logística para *Salmonella* spp. En relación a las granjas, se puede observar que la 5 presentó un OR de 0,19, lo cual indica que el riesgo de aislamiento de *Salmonella* spp. en esa granja es 19 % menor que en la granja 8 (de referencia). Las granjas 1, 2 y 7 no fueron estadísticamente diferentes. El riesgo de aislar *Salmonella* spp. en las semanas 20 y 24 fue 4,6 y 5,47 veces mayor que a las 8 semanas de vida. En relación a los grados de materia fecal, el aislamiento de *Salmonella* spp. fue un 90 % (OR:1,9) mayor en los *pooles* de materia fecal grado 1 que en aquellas muestras provenientes de cerdos sin diarrea. No se encontraron diferencias entre el grado 0 y los grados 2 y 4.

Tabla 13. Efecto de la granja, la edad, el grado de la materia fecal, la detección de *B. hyodysenteriae* y el aislamiento de *Salmonella* spp. en relación al riesgo de detección de *L. intracellularis*.

Detección de <i>Lawsonia intracellularis</i>				
Niveles de las variables	OR	IC superior	IC inferior	Valor de p
Granja 1	4,53	17,40	1,18	0,003
Granja 2	2,29	23,77	0,22	0,20
Granja 3	1,28	5,27	0,31	0,65
Granja 4	14,88	54,25	4,08	0,001
Granja 5	3,78	14,34	1,00	0,005
Granja 6	4,06	15,38	1,07	0,004
Granja 7				Ref.
Granja 8	8,85	32,89	2,38	0,001
Edad 8				Ref.
Edad 11				NR
Edad 14	7,46	26,16	2,13	0,002
Edad 17	12,30	43,14	3,51	0,001
Edad 20	30,88	106,14	8,98	0,001
Edad 24	47,47	163,17	13,81	0,001
Grado 0				Ref.
Grado 1	2,41	4,01	1,45	0,006
Grado 2	4,76	8,24	2,75	0,001
Grado 3				NR
Grado 4	32,14	157,21	6,57	0,001
<i>Salmonella</i>	0,42	1,00	0,18	0,04
PCR BH				NR

NR: no realizado por falta de dato positivo; Ref.: nivel de comparación o referencia.

Tabla 14. Efecto de la granja, la edad, el grado de la materia fecal, la detección de *L. intracellularis* y *B. hyodysenteriae* sobre el riesgo aislamiento de *Salmonella* spp.

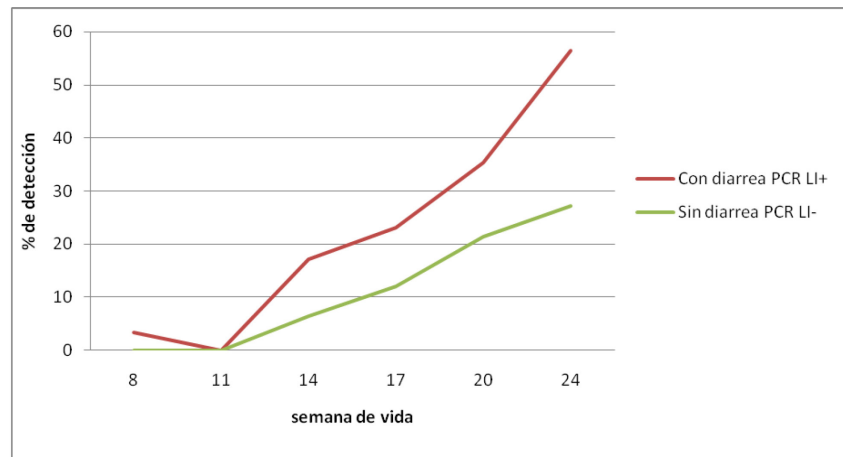
Aislamiento <i>Salmonella</i> spp.				
Niveles de las variables	OR	IC superior	IC inferior	Valor de p
Granja 1	0,85	1,76	0,41	0,650
Granja 2	0,44	1,00	0,19	0,50
Granja 3				NR
Granja 4				NR
Granja 5	0,19	0,54	0,07	0,002
Granja 6				NR
Granja 7	0,35	1,06	0,12	0,060
Granja 8				Ref.
Edad 8				Ref.
Edad 11				NR
Edad 14	2,36	7,35	0,76	0,13
Edad 17	2,27	7,09	0,73	0,15
Edad 20	4,60	13,66	1,55	0,006
Edad 24	5,47	16,73	1,79	0,003
Grado 0				Ref.
Grado 1	1,90	3,64	1,00	0,05
Grado 2	1,38	3,08	0,62	0,42
Grado 3				NR
Grado 4	2,61	15,88	0,43	0,29
PCR LI	0,53	1,17	0,24	0,11
PCR BH				NR

NR: No realizado por falta de resultado positivo; Ref.: nivel de comparación o referencia.

Análisis estadístico a nivel de lote

Las correlaciones entre los porcentajes de animales positivos a *L. intracellularis* con diarrea y sin diarrea en cada edad evaluada fue de carácter positivo ($\rho=0,71$; $p=0,0000$) (gráfico 4).

Gráfico 4. Correlación entre los animales positivos a *L. intracellularis* con diarrea y sin diarrea según la semana evaluada.



iii. Discusión

a. Frecuencia de animales positivos a los agentes en estudio

Las enfermedades entéricas son muy comunes entre las enfermedades de los porcinos y cuando están presentes en las etapas finales de la producción, afectan significativamente el rendimiento productivo (Viott y col., 2013). La identificación de aquellos agentes entéricos que circulan o se detectan con mayor frecuencia en una edad determinada resulta importante a la hora de las recomendaciones terapéuticas y la aplicación de medidas preventivas (Guedes y col., 2011). En este estudio se identificaron *L. Intracellularis*, *B. hyodysenteriae* y *Salmonella* spp. en cerdos de distintas edades, siendo más frecuente en animales de terminación. Los resultados de nuestro trabajo, ratifican que el uso de la técnica de PCR multiplex es una herramienta valiosa para la detección rápida y simultánea de estos patógenos. Mediante la aplicación de este método, en materia fecal de cerdos con y sin diarrea, en combinación con el cultivo de *Salmonella enterica*, se detectó la presencia clínica y subclínica de 3 de los agentes en estudio. *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* spp., *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* se identificaron en el 16,22 %, 6,6 %, 1,38 % y 0 % de las muestras respectivamente.

Salmonella enterica se aisló en 5/8 granjas (62,5 %), porcentaje similar al obtenido en un estudio previo en el que se estimó la prevalencia nacional de salmonelosis porcina (Parada, 2014). Si bien este no es un estudio de prevalencia, se remarca que existe una variación muy importante entre los porcentajes obtenidos en los distintos países productores de cerdos, presentando extremos bajos en países con programas de control y altos en países donde no se realizan dichos programas (10 % a 55 %) (Stege y col., 2000; Suh y Song, 2005; Biksi y col., 2007; Correia-Gomes y col., 2013; Nathues y col., 2013; Viott y col., 2013). Los programas de vigilancia que se implementan en países como Suecia, Dinamarca,

Finlandia y Noruega incluyen estrictas medidas de control en las granjas con denuncias obligatorias y compensaciones económicas (Alban y col., 2012).

En relación a las serovariedades de *Salmonella* presentes en el país, estudios previos en animales de faena, identificaron las siguientes serovariedades de *Salmonella enterica*: S. Schwarzengrund, S. Heidelberg, S. subesp. I 6,8:e,h:-, S. Derby, S. Typhimurium, S. Bredeney, S. Ohio, S. Senftenberg y S. Rissen (Vigo y col., 2006; Ibar y col., 2009). Por otro lado, en 2014, Parada, identificó a S. Typhimurium como la serovariedad más frecuente en cerdos de engorde. En nuestro estudio, las serovariedades identificadas difieren parcialmente de las de estos estudios, ya que además de S. Typhimurium (4,12:i:-) monofásica, identificamos S. Derby, S. Javiana, S. Tennessee, S. subsp I 3,10:z10:-. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium puede causar diarrea en cerdos y es un importante agente zoonótico (Vigo y col., 2009). Las evidencias sugieren que S. Typhimurium es el ancestro más probable del serotipo identificado como S. 4,12:i:-, ya que el alto índice de similitud indica que son clones (Guerra y col., 2000). Por lo tanto, se considera a S. 4,12:i:- una variante monofásica de S. Typhimurium. En general, las cepas monofásicas pueden aparecer como evolución de cepas ancestrales que no adquirieron los genes responsables de la expresión de un segundo antígeno flagelar o del mecanismo de “cambio de fase”, o como mutantes de cepas bifásicas que más recientemente, por diferentes eventos genéticos, han perdido los genes o la capacidad de expresión de alguno de los antígenos flagelares (Echeita y col., 2011). La novedad del hallazgo de esta variante monofásica de *Salmonella* está relacionada a su creciente incidencia en EE.UU. y países de Europa. Este serovar se considera emergente en humanos, asociado al consumo de carne de cerdo (Hauser y col., 2010). La identificación por nuestra parte de S. Typhimurium (4,12:i:-) resulta el primer reporte de una cepa monofásica en Argentina. Estudios previos demostraron la relación genética entre los aislamientos de cerdos y los de humanos

enfermos, subrayando la importancia de los animales de consumo como fuente y reservorio de *S. Typhimurium* (Parada, 2014; Hauser y col., 2010). El ganado porcino y la carne de cerdo parecían ser los principales reservorios de esta cepa y la fuente de infección humana (Echeita y col., 2011). Estos resultados, en conjunto, remarcan la variedad de serotipos presentes en cerdos, en granjas y en frigoríficos y expone el riesgo sanitario que implica la presencia de *Salmonella* en la producción porcina nacional.

Lawsonia intracellularis se identificó en todas las granjas y resultó ser el patógeno con mayor tasa de detección solo o asociado con otros agentes. Esto ratifica la amplia distribución de la infección en nuestro medio y es consistente con estudios previos serológicos que arrojaron un alto porcentaje de granjas positivas a *L. intracellularis* (Machuca y col., 2009). Al igual que en otros países criadores de cerdos, *L. intracellularis* es frecuentemente identificada en Brasil, donde se reportó que el 50 % de las granjas son positivas por la técnica de PCR, mientras que el 100 % presentó anticuerpos contra *L. intracellularis* (Viott y col., 2013; Resende y col., 2015). En países europeos y asiáticos, las detecciones a nivel granja varían entre el 48,4 % y 93,7 %, siendo endémica en la mayoría de ellos (Stege y col., 2000; Suh y Song, 2005; Biksi y col., 2007; Reiner y col., 2011; Dors y col., 2015). Las variaciones en los porcentajes de animales positivos pueden deberse al uso de antibióticos, la corta e intermitente eliminación de *L. intracellularis* y la larga duración de los anticuerpos en suero (Resende y col., 2015; Dors y col., 2015).

La disentería porcina es una enfermedad que al igual que las demás entidades presenta prevalencias muy variadas en países productores de cerdos (desde 0 % a 40 %) (Dors y col., 2015). La detección escasa de *B. hyodysenteriae* y la ausencia de *B. pilosicoli*, observada en este estudio, coincide con la baja detección de estos agentes en granjas intensivas en nuestro país informada previamente. Mediante estudios de PCR de materia fecal, de animales con diarrea, se detectó *B. pilosicoli* en 4/24 establecimientos y *B.*

hyodysenteriae en 2/24 establecimientos con uno a dos animales positivos por granja (Illanes y col., 2008). Carranza y col. presentaron en 2014, un estudio de prevalencia de *Brachyspira* spp. en animales de 22 semanas de vida en los cuales 1/52 y 2/52 granjas fueron positivas a *B. hyodysenteriae* y *B. pilosicoli* respectivamente. Mientras en muchos países la enfermedad se encuentra oculta por el uso de antibióticos, en otros lugares la prohibición del uso profiláctico, resultó en un incremento de la prevalencia (Ordóñez y col., 2013). En Europa se ha estimado que *B. hyodysenteriae* se encuentra presente entre el 2,5 % y 24 % de las granjas (Møller y col, 1998; Stege y col., 2000; Reiner y col., 2011), siendo igual de variable los porcentajes en Brasil (Baccaro y col., 2003; Viott y col., 2013). Si bien la relevancia de *B. hyodysenteriae* disminuyó en algunos países, EEUU y Brasil han reportado recientemente brotes de disentería porcina (Burrough, 2016; de Souza y col., 2013). La disminución de la prevalencia en algunos países a partir de la década del 90 se debió al manejo intensivo, tratamiento con drogas efectivas, adopción de técnicas todo dentro-todo fuera y mayor conocimiento y aplicación de normas de bioseguridad (Dors y col., 2015; Burrough, 2016). En Argentina, en las últimas décadas, también se implementaron cambios en el manejo y se mejoraron las medidas de bioseguridad, sumado a la posibilidad de contar con plantales de madres libres de disentería. Estos cambios explicarían también en nuestro país la baja tasa de detección de *Brachyspira* spp.

b. Frecuencia de detección por granja

- **Prevalencias intragranja:** dentro de cada granja, la prevalencia varió dependiendo del agente patógeno investigado, la edad de muestreo y flujo productivo. En las dos granjas positivas a *B. hyodysenteriae*, el porcentaje de identificación intrapredio fue bajo en comparación con otros autores que citan medias de detección en granjas positivas de hasta 75 % (Dors y col., 2015; Barcellos, 2003; Giacoboni, 1998). Esta tasa de detección, aún en

presencia de cuadro clínico en ambas granjas, podría asociarse al uso casi continuado de antibióticos vía oral y parenteral y al consumo de dietas de alta digestibilidad. Estudios previos postularon que los resultados negativos obtenidos mediante cultivo y/o PCR pueden deberse al uso de antimicrobianos (Barcellos y col., 2003). Además, los componentes de las dietas de los cerdos son consideradas factores que influyen en la patogenicidad de *Brachyspira* spp. interviniendo en el equilibrio de la microbiota intestinal (Burrough, 2016). Para prevenir la enfermedad, se utilizan dietas de alta digestibilidad que reducen la actividad fermentativa anómala en el intestino grueso y así evitan el crecimiento bacteriano (Ordóñez y col., 2013). Las granjas de nuestro estudio utilizaban dietas con formulaciones comerciales de compañías reconocidas del país, pudiendo ser esta, otra razón para la baja detección intragránja.

Los porcentajes de aislamiento de *Salmonella* en las granjas positivas varió entre 4,4 % y 16,7 %, similar a lo reportado en países de América del Norte y Europa en donde, a partir de un meta análisis, se calculó una prevalencia intragránja de 6,7 % (Fosse y col., 2009). Sin embargo, las comparaciones y la determinación de la prevalencia intragránja son difíciles debido a que en nuestro estudio se utilizaron *pooles* para el aislamiento lo que puede llevar a sobreestimar o subestimar la prevalencia individual (Parada y col., 2009).

En relación a *L. intracellularis*, la media de detección intragránja de nuestro estudio fue de 15,8 % (variable entre 3,7 % y 34,7 %). En un trabajo realizado en animales de entre 30 y 50 kg, se observó una media de 25 % de detección con un mínimo de 5 % y un máximo de 30 % (Stegge y col., 2000). Estas variaciones se relacionan con la existencia o no de antecedentes de diarrea en la granja y con las características de los establecimientos, que determinan el riesgo del ingreso, difusión y permanencia de la enfermedad (Jacobson y col., 2010).

Varias condiciones de alojamiento se pueden identificar como factores de riesgo para la ocurrencia sostenida de enfermedades entéricas dentro de una granja, tales como los días de vacío sanitario, el procedimiento de limpieza y desinfección, el control de roedores y pájaros, etc. (Jacobson y col., 2010). Al mismo tiempo, las bacterias estudiadas tienen una sobrevivencia considerablemente larga fuera del huésped. Por ejemplo *L. intracellularis* sobrevive 2 semanas en heces entre 5 y 15 °C; mientras que *B. hyodysenteriae* sobrevive en heces hasta 48 días. Además pueden ser transmitidas por fómites y vectores (Collins y col., 1999; Friedman y col., 2008; Burrough, 2016). La limpieza y la desinfección no eliminan a *Salmonella* del medio ambiente de las granjas y la contaminación residual podría ser responsable de las nuevas infecciones. Un estudio demostró la asociación entre la proporción de hisopos ambientales positivos y la proporción de muestras de cerdos positivos, lo que sugiere que el medio ambiente contaminado contribuye a la infección en los animales (Pires y col., 2013). En los sistemas de alojamiento modernos, la persistencia de agentes patógenos se ve favorecida por el elevado número de animales en un espacio limitado y por el escaso tiempo para limpiar, desinfectar y secar adecuadamente los corrales entre lotes sucesivos (Jacobson y col., 2010; Burrough, 2016). En las granjas evaluadas, los responsables de la producción, preferían maximizar el uso de las instalaciones de engorde, en detrimento de respetar los periodos de vacío sanitario adecuados. Además, se identificaron en mayor o menor medida, flujo continuo de engorde, falta de personal exclusivo por sectores, ausencia de pediluvios en el ingreso a galpones, presencia de otras especies en la granja y en los galpones. Otros factores relacionados con la prevalencia intragranja son la mezcla de animales de diferentes edades y la presencia de cerdas portadoras subclínicas, sobre todo en granjas monositios (Burrough, 2016).

- **Evaluación del riesgo de detección por granja:** la variable “granja”, que incluye el manejo, alojamiento, alimentación, bioseguridad, etc. influyó en el riesgo de detección de *L.*

intracellularis. En las granjas 7, 3 y 2, la detección intrapredial fue de 3,7 %, 7,7 % y 10,7 %, respectivamente y el riesgo de detección no presentó diferencias significativas entre sí. Las granjas 1, 6 y 5 presentaron un riesgo de detección de *L. intracellularis* 4,5, 4 y 3,7 veces más que las granjas previamente mencionadas. Los valores más altos de riesgo de *L. intracellularis* de 14,8 y 8,8 veces más, se observaron en las granjas 4 y 8 respectivamente, las cuales incluso fueron categorizadas con cuadro clínico de diarrea. Estos resultados son similares a los presentados por otros autores, donde las mayores detecciones se obtuvieron en granjas con problemas clínicos de diarrea (Stege y col., 2000; Møller y col., 1998).

En el caso de *Salmonella* spp. la granja 5 presentó menor riesgo de detección que la granja 8. En cambio, las granjas 1, 2, 7 y 8 no mostraron diferencias significativas entre sí. Las variaciones en el riesgo de aislamiento de *Salmonella* y de detección de *L. intracellularis* pueden deberse al uso de antibióticos, a la eliminación intermitente en heces y a la eliminación de un número mínimo de bacterias en las infecciones subclínicas (Jacobson y col., 2010; Vigo y col., 2009).

c. Detecciones por edad

Un alto porcentaje de detección de *L. intracellularis* y *Salmonella* spp. se observó en las categorías de mayor edad indicando que el riesgo de detección de *L. intracellularis* y *Salmonella* spp. incrementó al aumentar la edad de los animales. En el caso de *Salmonella*, el riesgo de detección fue estadísticamente mayor a las 20 y 24 semanas de vida y para *L. intracellularis*, a partir de las 14 semanas de vida, duplicándose entre las 17 y 20 semanas. El riesgo de detección de *L. intracellularis* a las 24 semanas fue 47 veces más que el riesgo de detección a las 8 semanas de vida. La dinámica de infección encontrada en nuestro estudio para *L. intracellularis* difiere de los resultados descritos en países europeos donde no se observan diferencias en la prevalencia de estos patógenos en distintos grupos de

edades (Stege y col., 2004; Dors y col., 2015). En los países donde no se permite la administración de antimicrobianos para uso preventivo, la eliminación en materia fecal de *L. intracellularis* tiende a ocurrir más tempranamente, alrededor de cuatro o seis semanas después del destete (Brandt y col., 2010). Se ha postulado que el uso de antimicrobianos reduce la presión de infección de *L. intracellularis* en las etapas de recría y crecimiento temprano, retrasando la edad de infección y la excreción, por lo que su detección ocurre en la fase de terminación en concordancia con el retiro de antibióticos (Resende y col., 2015; McOrist y Gebhart, 2012). Se demostró que el impacto de la infección por *L. intracellularis* en la GDP es mayor en cerdos de terminación que en animales de crecimiento (McOrist y col., 1997). Es por esto, que en las granjas evaluadas, el impacto productivo por la infección podría ser más alto. Por otro lado, en 5 granjas se encontraron animales de entre 14 y 24 semanas con materia fecal grado 4, positivos a *L. intracellularis*. Estos animales presentaron la diarrea típica de EPH la cual suele ocurrir en cerdos de más de 4 meses sin inmunidad previa a *L. intracellularis* y ante la presencia de una dosis alta de bacterias (Jacobson y col., 2010). En nuestro estudio, si bien no se evaluó el estatus inmunitario de los animales en relación a *L. intracellularis* ni se cuantificó la cantidad de microorganismos presentes, la detección en presencia de diarrea con sangre digerida alerta sobre el riesgo de la presentación aguda de enteropatía en los cerdos sometidos en edades tempranas a antibioticoterapia. El riesgo de esta presentación es su alta letalidad (más de 50 %) y la posibilidad de una mayor difusión de la enfermedad ya que la bacteria es eliminada por materia fecal en grandes dosis (Jacobson y col., 2010; McOrist, 2005).

En nuestro estudio el riesgo de detección de *Salmonella* fue 4,6 y 5,5 veces mayor a las 20 y 24 semanas que a las 8 semanas de vida, respectivamente. Esto concuerda con otros autores que encontraron que la prevalencia fue más alta en cerdos en edad de faena (Parada 2014; Rostagno y col., 2012) y se contrapone con otros estudios que indican una

disminución de la detección durante la etapa de crecimiento y terminación asociada al uso de antibióticos como promotores del crecimiento y al control de enfermedades respiratorias o la inmunidad natural a la infección (Vigo y col., 2009; Kranker y col., 2003; Pires y col., 2013). En ausencia de antibióticos, la dinámica de la infección por *Salmonella* muestra mayor detección entre las 10 y 14 semanas de vida. No está claro si esta asociación representa la evolución natural de *Salmonella* en porcinos, ya que los animales jóvenes son más susceptibles a la infección bacteriana (Pires y col., 2013). La importancia del retraso de la infección con *Salmonella* spp. radica en que los cerdos positivos pueden infectar a otros animales durante el transporte o en el tiempo de espera pre-faena e incrementar el riesgo de contaminación de las carcasas (Belceil y col., 2004). En este sentido, algunas acciones deberían ser consideradas en las granjas ante la presencia de *Salmonella* spp. en la etapa de engorde y a lo largo de la cadena de producción de carne de cerdo (transporte, periodo de espera, rutina de faena) para disminuir los riesgos de contaminación de la carne, considerando el riesgo para la salud pública y la seguridad alimentaria en el país.

d. Presencia de diarrea

Los patógenos en estudio se identificaron con más frecuencia en heces diarreicas que normales, indicando la relación entre la presencia de agentes en materia fecal y el desarrollo de diarrea. *Brachyspira hyodysenteriae* solamente se detectó en cerdos con diarrea, en concordancia con estudios previos que reportan que la detección de *B. hyodysenteriae* es más frecuente en cerdos con diarrea y en granjas con historia de diarrea (Biski y col., 2007; Møller y col., 1998; Reiner y col., 2011). Más allá de los factores de patogenicidad de la bacteria, la enfermedad y los signos clínicos dependen de co-factores tales como la composición de la dieta, estado inmune del animal, secreción de ácido estomacal, dosis del agente infeccioso, virulencia de la cepa y presencia de otros

organismos anaeróbicos en el intestino (Burrough, 2016; Ordóñez y col., 2013; Duff y col., 2015). Dependiendo de estos factores, los signos clínicos en la disentería porcina en cerdos jóvenes pueden ir desde una diarrea mucosa sin alteración de la condición corporal hasta una grave diarrea hemorrágica (Burrough, 2016). En nuestro estudio, la mayor parte de las diarreas fueron grado 3 (con sangre fresca), aunque también se encontraron grados 1 y 2. No se hallaron animales positivos sin diarrea. En contraposición, en otros estudios se consignó que la infección subclínica provocada por *B. hyodysenteriae* ocurre en cerdas y es considerada importante, debido a la posibilidad de transmisión del agente entre granjas y a los lechones en el parto. En nuestro estudio no se incluyó materia fecal de cerdas y lechones jóvenes, pero la nula detección de animales positivos sin diarrea podría asociarse con el esquema de muestreo, la baja dosis de bacterias excretadas, el límite de detección de la prueba utilizada y/o los tratamientos antibióticos (Burrough, 2016; Duff y col., 2015).

Se obtuvo asociación entre la detección de *L. intracellularis* y la presencia de diarrea (OR= 2,3; IC: 1,6-3,3; $p<0,05$). En un estudio previo, la presencia de *L. intracellularis* aumentó el OR de diarrea en el rebaño en un factor de 1,5 (Møller y col., 1998). Además, se ha demostrado la presencia de *L. intracellularis* en granjas con mala *performance* e historia de diarrea, revelando que esos son los signos clínicos en granjas endémicas (Jacobson y col., 2000). Otros autores, demostraron la correlación entre la ocurrencia de diarrea, las lesiones intestinales y la disminución de la GDP. Así, determinaron que cuando la diarrea es más líquida, la cantidad de bacterias eliminadas es mayor, la disminución de la GDP también y las lesiones resultan más extensas (Pedersen y col., 2012a; Pedersen y col., 2012b). El riesgo de detección de *L. intracellularis* según la puntuación de grado de materia fecal 1, 2 y 4 fue de 2,4; 4,8 y 32,1 veces mayor que el grado 0 respectivamente, indicando que cuando la diarrea es más líquida y/o contiene sangre digerida, la posibilidad que esa diarrea se encuentre asociada a *L. intracellularis* es mayor. Este hallazgo es de gran valor al

momento de seleccionar la muestra de materia fecal para la detección por PCR de *L. intracellularis*.

El porcentaje elevado de cerdos con material fecal grado 0 que resultaron positivos a *L. intracellularis*, alcanzaron un 10,9 % de todos los cerdos sin diarrea evaluados y el 35 % de todos los animales positivos a *L. intracellularis*. Estos altos porcentajes nos muestran que la infección subclínica está muy presente en las categorías estudiadas y representa un riesgo sanitario y productivo para las explotaciones. En las granjas con infecciones crónicas-subclínicas, los animales exhiben materia fecal de características normales o “flojas”, de color verdoso o ligeramente amarillento (McOrist y Gebhart, 2012). Estas características fueron vistas en nuestro trabajo, donde *L. intracellularis* se identificó en 21 lotes de cerdos, pero solo 9 presentaron entre 4 % y 6,8 % de animales con diarrea y en la mitad de estos lotes hubo entre 1 y 5 animales con grado 4 (de alto riesgo de ser *L. intracellularis* positivo). Los demás lotes positivos presentaron bajos porcentajes de diarrea y la mayoría de color verdoso o verde-amarillento y fueron categorizados como lotes con infección subclínica. El efecto de la presencia de lotes con manifestación subclínica, radica en menor ganancia de peso y animales desparejos (McOrist y Gebhart, 2012). Un estudio experimental utilizando distintas dosis de *L. intracellularis*, determinó que los animales inoculados con bajas dosis presentaron, en ausencia de diarrea, una menor GDP y lesiones intestinales microscópicas (Paradis y col., 2012). Es así que a la merma productiva se suma la posibilidad de estos animales de infectar a sus compañeros de corral (Jacobson y col., 2010).

En este trabajo, se observó una relación de 2,5:1 entre animales con y sin diarrea positivos a *L. intracellularis* y además se evidenció una correlación positiva. Esto indica que cuando en un lote se observan animales con diarrea, una proporción de animales sin diarrea también son positivos. Un animal con diarrea elimina 7×10^8 bacterias por gramo de materia fecal, siendo la dosis infectante para un cerdo de 10^4 a 10^6 microorganismos totales

(Jacobson y col., 2010). Sobre esta base, es posible que la mayor presión de infección en un corral, dada por la presencia de animales con diarrea positivos a *L. intracellularis*, sea la causa de la elevada cantidad de animales infectados subclínicamente.

No se observó asociación entre la identificación de *Salmonella* spp. y la presencia de diarrea en los cerdos, aunque sí se observó un OR de 1,9 ($p > 0,05$) para el aislamiento de la bacteria en materia fecal grado 1, en comparación con la grado 0. Las razones de la falta de asociación con la diarrea pueden ser la utilización de *pooles* para el aislamiento de *Salmonella* spp. y la identificación de especies no patógenas para el cerdo (Vigo y col., 2009; Parada y col., 2013). En contraposición a esto, si bien no hubo diferencias estadísticas, en la granja 8, *S. Typhimurium* fue identificada principalmente en cerdos con diarrea y positivos a *L. intracellularis*. Igualmente, no se pudo determinar si la diarrea es causada por uno o ambos agentes ya que solo se obtuvo materia fecal. Sin embargo, también se detectó *Salmonella* a partir de cerdos portadores subclínicos.

En un porcentaje elevado de muestras de materia fecal grado 1 no se detectó ninguno de los agentes estudiados. La diarrea leve en cerdos de engorde puede ser causada por factores no infecciosos asociados al cambio de dieta cuando los animales cambian de categoría. El aumento de proteína vegetal (principalmente soja) en relación a la proteína animal, puede resultar en materia fecal más líquida y con restos de alimento sin digerir (Thomson y Friendship, 2012). Recientemente, se introdujo el término de “diarrea de baja patogenicidad” cuando no se detectan agentes patógenos en animales con diarrea no hemorrágica. Así, las diarreas de baja patogenicidad deben diferenciarse de las infecciosas ya que potencialmente no requieren tratamiento con antibióticos ni antiparasitarios y no afectan la producción (Pedersen y col., 2014).

e. Necropsias

En las necropsias realizadas, 15/69 casos se asociaron a entidades entéricas infecciosas, siendo reiteradamente *L. intracellularis* la bacteria más frecuente tanto en animales con y sin lesiones macroscópicas y microscópicas. Nuevamente se destaca la importancia de *L. intracellularis* como agente causal de enteropatía, clínica y subclínica. De esto se desprende la necesidad de utilizar técnicas sensibles para el diagnóstico, sobre todo en ausencia de lesiones y con sospecha de enfermedad a nivel poblacional. Son indicados el uso conjunto de PCR a partir de raspaje de mucosa y/o IHQ más histopatología, ya que ambas técnicas complementarias mejoran significativamente la sensibilidad del examen *post mortem*, más aun cuando se evalúa un bajo número de animales o si los mismos no son seleccionados en función de los signos clínicos presentes (Stevenson, 2001). En la granja 3, en la inspección macroscópica del intestino grueso, las lesiones fueron sutiles y no se observaron las larvas del parásito *T. suis*, las que sí se identificaron en la evaluación microscópica. Aún en ausencia de lesiones, se recomienda el apoyo diagnóstico de laboratorio para identificar el agente causante de diarrea, considerando además, agentes poco frecuentes entre los diagnósticos diferenciales (Ladinig y col., 2009, Huerta y col., 2003; Pittman y col., 2010). A diferencia del estudio retrospectivo, donde solo se observó un caso de *T. suis*, aquí observamos 3 casos en una granja intensiva de 2000 madres. Esto nos indica la variación existente en la detección de agentes en el tiempo.

f. Infecciones mixtas en animales vivos y muertos

En 3/15 necropsias se observaron infecciones mixtas, resultado mayor al encontrado en animales vivos. Esto podría coincidir con lo postulado por Jacobson y col., (2003) que propone que el riesgo de desarrollar la enfermedad clínica (y morir) podría aumentar si dos patógenos están presentes, ya que el daño intestinal probablemente sea más extenso. En la

granja 3 se identificó *T. suis* y PCV-2, además de *L. intracellularis* la cual también había sido detectada en animales vivos.

En nuestro estudio, el uso conjunto de técnicas diagnósticas anatomopatológicas y de biología molecular aumentó la posibilidad de detección de agentes entéricos en una granja. Si bien en 7/8 granjas se identificó más de un agente patógeno, no se detectó una relación estadísticamente significativa entre estos patógenos a nivel individual ni a nivel granja. En animales vivos, la principal combinación observada en 11 cerdos (1,16%) fue *S. Typhimurium* y *L. intracellularis* en concordancia con otros estudios reportados, donde las infecciones mixtas no superan el 2,2 % de las muestras (Suh y Song, 2005; Dors y col., 2015). Al parecer, es más frecuente el observar más de un agente a nivel granja que a nivel individual, y en animales muertos más que en animales vivos. Esta podría ser una de las causas de los fracasos terapéuticos (Biksi y col., 2007; Baccaro y col., 2003). Además, en las infecciones mixtas con participación de parásitos, los tratamientos antiparasitarios son necesarios para combatir la infestación (Pittman y col., 2010) y dichos agentes podrían estar asociados a la presencia de diarrea. La identificación de múltiples agentes enteropatógenos en cuadros clínicos y subclínicos de cerdos de engorde hace necesario un estudio integral de la microbiota intestinal, a fin de comprender la etiopatogenia de los cuadros entéricos.

iv. Conclusiones

1. Se identificaron *L. intracellularis* y *Salmonella* a partir de animales con y sin cuadro clínico, mientras que *B. hyodysenteriae* solo se detectó a partir de animales con diarrea.
2. *Lawsonia intracellularis* se identificó en todas las granjas, en animales con y sin diarrea, tanto solo como asociado con otros agentes.
3. *Brachyspira hyodysenteriae* solo se detectó en lotes con elevados porcentajes de diarrea, en contraposición a *L. intracellularis* que se identificó mayoritariamente en lotes con infección subclínica.
4. Se reporta por primera vez en Argentina la identificación de una cepa monofásica de *S. Typhimurium*, patógeno emergente en humanos y que se asocia al consumo de carne de cerdo (*S. subespecie 1 (4,12:i:-)*).
5. La variable "granja" influyó en el riesgo de detección de *L. intracellularis*. Las características de las granjas tales como el flujo, higiene, manejo, instalaciones, bioseguridad, etc. pueden contribuir a las prevalencias intragranja.
6. Las granjas con cuadro clínico de diarrea presentaron un riesgo de detección de *L. intracellularis* de 14,8 y 8,8 veces más que las granjas sin problemas.
7. El riesgo de detección de *L. intracellularis* y *Salmonella spp.* aumentó con la edad de los animales.
8. El mayor riesgo de detección de *L. intracellularis* en animales próximos a la faena implica un riesgo para la presentación aguda y de alta mortalidad de EPP.
9. El mayor riesgo de aislamiento de *Salmonella* en animales de 20 y 24 semanas de vida aumenta la posibilidad de enviar cerdos positivos a la faena.
10. En las granjas en estudio, cada 2,5 cerdos con diarrea positivos a *L. intracellularis*, existe 1 sin signos clínicos evidentes y señala la importancia de los animales subclínicos.

11. El 81 % de las muestras grado 1 fueron negativas a los 4 agentes estudiados. La diarrea leve en cerdos de engorde podría ser causada por factores no infecciosos u otros infecciosos no incluidos en el estudio.
12. La colección de muestras estratégicas (con sangre, mucus, fibrina, etc.), destinadas a un abordaje diagnóstico etiológico poblacional, brinda más posibilidades de detectar el/los agentes/s causales de diarrea.
13. El examen macroscópico de las lesiones intestinales debe ir siempre acompañado de estudios microscópicos, microbiológicos y moleculares para aumentar la sensibilidad del diagnóstico.
14. La técnica de PCR multiplex es una herramienta valiosa para la detección rápida y simultánea de agentes entéricos a partir de materia fecal en cerdos con infecciones clínicas y subclínicas. Además constituye una técnica útil para evaluar la coinfección y la dinámica de las infecciones entéricas.

5. Capítulo 3: Efecto de la presencia de enteropatógenos sobre los parámetros productivos y estimación del costo de EPP y DP

Objetivos específicos

- ❖ Evaluar el efecto de la presencia de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella* spp sobre los parámetros productivos y el impacto económico directo, en cuadros clínicos y subclínicos.

i. Materiales y métodos

a. Efecto de la presencia de enteropatógenos sobre los parámetros productivos y sanitarios: evaluación a nivel granja

Se utilizó la correlación de Pearson para determinar la fuerza y sentido de asociación entre las siguientes variables: porcentaje de detección global de cada agente/ granja, GDP, peso al final de recría, mortalidad en la etapa de recría, mortalidad en la etapa de engorde, grado de bioseguridad, número de madres y número de sitios.

El grado de bioseguridad se estableció a partir de la información obtenida en la encuesta. Se categorizó como buena, regular o mala según la cantidad de normas de bioseguridad cumplidas. Cada medida de bioseguridad fue puntuada con 1 cuando se cumplía y con 0 cuando no se cumplía (Laanen y col., 2013). La sumatoria de ellas, otorgó un valor numérico que se categorizó en: grado 1 (mala bioseguridad, sumatoria de valores entre 1-5); grado 2 (regular bioseguridad, sumatoria de valores entre 6-10) y grado 3 (buena bioseguridad, sumatoria de valores entre 11-15) (ver anexo, planilla 1 y 2).

b. Análisis de los costos directos de enteropatía proliferativa porcina y disentería porcina

Para obtener el costo directo asociado a DP y EPP se consideraron en el cálculo la **pérdida económica asociada a la disminución de la GDP**, más los **gastos en antibiótico utilizado por cerdo**. La mortalidad no se incluyó dado que no resultó posible obtener, en ninguna de las granjas, el dato preciso respecto del número y peso de los animales que murieron a causa de las enfermedades estudiadas.

Se realizaron los siguientes cálculos basados en lo descrito por Bennett y col. (1999) y McOrist y col. (1997):

Estimación del gasto en antibióticos por cerdo

Para el cálculo del gasto en antibióticos por cerdo se tuvieron en cuenta:

*peso vivo en kg y consumo de alimento por semana de vida en kg: estos datos se obtuvieron de una tabla técnica provista por una empresa de genética comercial (Anónimo, 2014).

*tratamientos antibióticos: se utilizó la información obtenida en la encuesta:

-principios activos utilizados en cada edad. Solo se incluyeron las drogas utilizadas de forma oral, vía alimento o agua, y no aquellas inyectables, ya que ninguna de las granjas contaba con su registro de uso.

-duración en días de los tratamientos

-dosis en mg/kg

-concentración de la droga en la presentación farmacéutica empleada

*precio de los antibióticos por kilo o litro de producto comercial utilizado

En los casos en que se utilizó más de una droga por ciclo productivo, se sumaron los costos por droga administrada para obtener el **gasto en antibióticos por cerdo**.

Estimación de la pérdida económica asociada a la disminución de GDP por cerdo

Para calcular la pérdida económica que produce la disminución de la GDP en cada cerdo engordado, se utilizó la siguiente información y cálculo:

Información utilizada:

*tasa de detección global de cada agente por granja

*población en riesgo: cerdos engordados por semana

*precio medio ponderado por kg de cerdo vendido: para esta variable se utilizaron los datos oficiales del Ministerio de Agroindustria

*ganancia diaria de peso de cada granja: dato obtenido en la encuesta

*porcentajes máximo y mínimo de reducción de la ganancia diaria de peso: para *L. intracellularis*, los porcentajes de reducción utilizados fueron 31 % y 9 % (McOrist y col., 1997) y en el caso de *B. hyodysenteriae* 62 % y 10 % (Barcellos y col., 2010), respectivamente

*periodo crítico de la enfermedad: 8 semanas de reducción de GDP (McOrist y col., 1997)

Cálculo:

Población en riesgo X tasa detección global X reducción de la GDP X precio del cerdo=

Pérdida económica asociada a la disminución de la GDP por semana

Pérdida económica asociada a la disminución de la GDP por semana/ población en

riego= **Pérdida económica asociada a la disminución de la GDP por cerdo**

Estimación del costo de las enfermedades entéricas

Para determinar el costo directo de las enfermedades entéricas se sumaron **las pérdidas económicas asociadas a la disminución de la GDP por cerdo y el gasto en antibióticos por cerdo**. En las granjas donde se presentaron las dos enfermedades, se adicionaron los costos individuales de cada una de ellas.

ii. Resultados

a. Efecto de la presencia de enteropatógenos sobre los parámetros productivos: evaluación a nivel granja

En función de la categorización de bioseguridad las granjas 1, 3, 4, 5, y 8 se clasificaron como grado 3, la 2 se categorizó como grado 2 y las granjas 6 y 7 como grado 1. En la tabla 15 se presenta un resumen de los porcentajes de detección de cada agente por granja, GDP, peso de recría, peso de venta, días a la venta, mortalidad en la etapa de recría, mortalidad en la etapa de engorde, grado de bioseguridad, número de madres y cantidad de sitios. En la tabla 16 se muestran resultados respecto de las fuerzas y sentido de asociación entre las variables con significación estadística. No se observaron asociaciones estadísticamente significativas para las variables: detección de *L. intracellularis*, aislamiento de *Salmonella* spp., cantidad de sitios de la granja y número de cerdas.

b. Análisis de los costos directos de enteropatía proliferativa porcina y disentería porcina

Estimación del gasto en antibióticos por cerdo

Para el cálculo de los costos se consideraron los valores de los insumos y el precio del capón en pie de agosto de 2014. En la planilla 3 del anexo se presentan los costos del tratamiento por cada cerdo engordado, según la edad y el antibiótico utilizado por granja. El costo total de cada plan sanitario por cerdo fue: granja 1: \$13,6; granja 2: \$28,9; granja 3: \$21,1; granja 4: \$26,2; granja 5: \$15,8; granja 6: \$34,5; granja 7: \$51,9; granja 8: \$25,5.

Estimación de las pérdidas económicas asociadas a la disminución de la GDP por cerdo

Los resultados de las pérdidas económicas para *L. intracellularis* y *B. hyodysenteriae*, se muestran en las tablas 17 y 18, respectivamente.

Estimación del costo directo de las enfermedades entéricas

En la tabla 19, se indica el costo directo de las enfermedades estudiadas con el impacto mínimo y máximo por cerdo, en cada granja.

Tabla 15. Detección de agentes enteropatógenos, datos productivos y sanitarios en cada granja

Granja	Cerdas	Sitios	<i>B. hyodysenteriae</i> (%)	<i>L. intracellularis</i> (%)	<i>Salmonella</i> spp. (%)	Mortandad recría (%)	Mortandad engorde (%)	Grado de bioseguridad	Peso recría (kg)	Peso engorde (kg)	GDP (kg)	Días a la venta
1	1000	1	0	15,9	16,7	0,8	3,2	3	31	119	0,73	163
2	600	1	0	10,7	8,3	3,31	3,5	2	28,95	111	0,69	159,5
3	2500	3	0	7,7	0	4,58	4,4	3	23,45	117,3	0,69	170
4	660	1	0	34,7	0	0,8	3,2	3	31	119	0,70	170
5	1000	2	0	14,9	4,2	2	6,0	3	29	109	0,64	171
6	400	1	5,9	14,3	0,0	10	5	1	23,18	95,2	0,57	166
7	70	1	7,4	3,7	6,3	-	-	1	-	104,2	0,59	175,8
8	1500	3	0	24,2	16,0	1,4	3,5	3	30	107	0,73	147

Bh: *B. hyodysenteriae*; Li: *L. intracellularis*; GDP= ganancia diaria de peso. Kg= kilogramos; -: sin dato

Tabla 16. Correlaciones con significación estadística entre las distintas variables evaluadas

Variabes	Valor de correlación	Valor de <i>p</i>
Peso recría y mortalidad en recría	-0,88	0,008
Detección de BH y mortalidad recría	0,9	0,004
Detección de BH y bioseguridad	-0,88	0,008
Detección de BH y GDP	-0,84	0,016
Mortalidad recría y bioseguridad	-0,87	0,016
Mortalidad recría y GDP	-0,84	0,010
Bioseguridad y GDP	0,77	0,040

BH: *B. hyodysenteriae*; GDP= ganancia diaria de peso.

Tabla 17. Pérdida económica asociada a *L. intracellularis*.

	Granja 1	Granja 2	Granja 3	Granja 4	Granja 5	Granja 6	Granja 7	Granja 8
Detección de <i>L. intracellularis</i>	0,15	0,1	0,07	0,35	0,15	0,14	0,04	0,24
Población en riesgo por semana	500	300	1250	330	500	200	35	750
GDP promedio	0,730	0,700	0,69	0,700	0,640	0,570	0,590	0,730
% pérdida mínimo en GDP	9	9	9	9	9	9	9	9
% pérdida máximo en GDP	31	31	31	31	31	31	31	31
Impacto en kg (GDP mínima)	0,066	0,063	0,062	0,063	0,058	0,051	0,053	0,066
Impacto en kg (GDP máximo)	0,226	0,217	0,214	0,217	0,198	0,177	0,183	0,226
Periodo en días crítico de la enfermedad	56	56	56	56	56	56	56	56
Kilogramos mínimos no ganados /cerdo	3,7	3,5	3,5	3,5	3,2	2,9	3,0	3,7
Kilogramos máximos no ganados /cerdo	12,7	12,2	12,0	12,2	11,1	9,9	10,2	12,7
Mínimo de kg perdidos/semana	275,9	113,2	304,3	404,0	240,3	82,2	3,9	662,3
Máximo kg perdidos/semana	950,5	390,1	1048,1	1391,5	827,7	283,0	13,3	2281,1
Valor Kg de carne*	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4
Pérdidas mínimo en \$/semana	2858,7	1173,3	3152,4	4185,3	2489,6	851,2	39,9	6861,0
Pérdidas máximo \$/semana	9846	4041	10858	14416	8575	2931	137	23632
Pérdida de \$/cerdo mínimo	5,72	3,91	2,52	12,68	4,98	4,26	1,14	9,15
Pérdida de \$/cerdo máximo	19,69	13,47	8,69	43,69	17,15	14,66	3,93	31,51

*precio promedio del kilogramo de cerdo en pío (agosto de 2014).

Tabla 18. Pérdida económica asociada a *B. hyodysenteriae*.

	Granja 6	Granja 7
Detección de <i>B. hyodysenteriae</i>	0,06	0,07
Población en riesgo por semanal	200	35
GDP promedio	0,570	0,590
% pérdida mínimo en GDP	10	10
% pérdida máxima en GDP	62	62
Impacto en kg (GDP mínimo)	0,057	0,059
Impacto en kg (GDP máxima)	0,353	0,366
Periodo en días crítico de la enfermedad	56	56
Kilogramos mínimos no ganados /cerdo	3,2	3,3
Kilogramos máximos no ganados /cerdo	19,8	20,5
Mínimo de kg perdidos/semana	38,3	8,6
Máximo kg perdidos/semana	237,5	53,1
Valor del Kg de carne*	10,4	10,4
Pérdidas mínimo en \$/semana	396,8	88,7
Pérdidas máximo \$/semana	2460,3	549,7
Pérdida de \$/cerdo mínimo	1,98	2,53
Pérdida de \$/cerdo máximo	12,30	15,70

*precio promedio del kilogramo de cerdo en pie (agosto de 2014).

Tabla 19. Costo total de las enfermedades entéricas por cerdo en cada granja.

	Granja 1	Granja 2	Granja 3	Granja 4	Granja 5	Granja 6	Granja 7	Granja 8
PÉRDIDAS POR EPP								
Pérdida mínima/cerdo	5,72	3,91	2,52	12,68	4,98	4,26	1,14	9,15
Pérdida máxima/cerdo	19,69	13,47	8,69	43,69	17,15	14,66	3,93	31,51
PÉRDIDAS POR DP								
Pérdida mínima/cerdo						1,98	2,53	
Pérdida máxima/cerdo						12,30	15,70	
GASTO ANTIBIOTICO								
Gasto en antibióticos	13,59	28,88	21,14	26,25	15,85	34,53	51,98	25,48
COSTO TOTAL EPP ó EPP+DP*								
Costo total mínimo de la enfermedad/cerdo engordado	19,3	32,8	23,7	38,9	20,8	40,8	55,6	34,6
Costo total máximo de la enfermedad/cerdo engordado	33,3	42,3	29,8	69,9	33	61,5	71,6	57

Valores expresados en pesos argentinos.

v. Discusión:

a. Impacto productivo

Bajo las condiciones de nuestro estudio, no se observaron correlaciones entre la detección de *L. intracellularis* o *Salmonella* spp. y la GDP. Las infecciones entéricas producen pérdidas productivas debido a la mala absorción intestinal de nutrientes y agua, pero los porcentajes de reducción de peso que se citan en los estudios experimentales y de campo son variables ya que dependen de la edad de infección, la dosis infectante, el grado de lesión intestinal y de la reducción del consumo de alimento, siendo para la infección con *L. intracellularis* desde el 6 al 42 % (Paradis y col., 2012; McOrist y col., 1997; Stege y col., 2004; McOrist y col., 2006). En nuestro estudio, es posible que el impacto productivo se diluya al haber utilizado la GDP de nacimiento-venta por carecer de datos de GDP de la etapa de engorde. Por ejemplo, en un estudio en una granja comercial, los cerdos infectados con *L. intracellularis* disminuyeron la GDP 50 g/día y ese efecto no fue estadísticamente significativo (Brant y col., 2010). En otro estudio se observaron variaciones de la GDP de 19 a 27 % respecto de la granja con menor detección, y solo fue estadísticamente significativa la granja con 27 % de reducción del peso (Stege y col., 2004). Estudios longitudinales de infección por *L. intracellularis* indican que los cerdos ganan menos peso en el transcurso de la enfermedad pudiendo luego compensar parcialmente la ganancia de peso hasta la faena (Stege y col., 2004).

En el presente estudio se observaron granjas sin problemas de diarrea y con detecciones bajas a moderadas de *L. intracellularis*, en las cuales la enfermedad fue considerada subclínica. Se ha postulado que la EPP es la enfermedad subclínica que más pérdidas productivas produce en la cría porcina (McOrist, 2005). En ensayos de vacunas en granjas subclínicas, los animales vacunados presentaron menor tasa de mortalidad, mayor

GDP y mejores características de la canal que los cerdos no vacunados (McOrist y Smits 2007; Park y col., 2013). En otro estudio, las diferencias entre vacunados y no vacunados fueron de 48 g/día durante en el periodo de engorde. Finalmente la media res de cerdos vacunados pesaba 5,7 kg más que la de los no vacunados (Scholz y col., 2011).

La detección de *B. hyodysenteriae* se correlacionó positivamente con la tasa de mortalidad y negativamente con la GDP. La asociación observada se correspondió con una baja GDP en los animales, no alcanzando los 600 gramos diarios en la granjas positivas, mientras que las negativas fueron de alrededor de 700 gramos diarios. Disentería porcina afecta la *performance* productiva ya que causa una reducción en la GDP de entre 10 y 62 % y una disminución en la eficiencia de conversión de 10 a 90 % (Barcellos y col., 2010). Asimismo la recuperación no es completa, por lo tanto los animales persisten con una menor GDP hasta la faena (Hampson y col., 2012). Además, las condiciones de alojamiento y otros signos clínicos observados en estas granjas (diarrea en maternidad, tos y retraso en recría) pudieron participar en la reducción de la GDP y el bajo peso a la salida de la recría, en el bajo peso de venta y en la alta mortalidad. Nuestros resultados coinciden con otros autores que ubican a la DP como una enfermedad grave (Hampson 2006) y que genera un daño importante en la economía de una granja, tal como se pudo observar en las granjas 6 y 7. Un estudio realizado en los EE.UU., en el que se analizó y clasificó la productividad de las granjas, concluyó que los lotes de animales con disentería fueron 20 veces más propensos a ubicarse en el cuartil inferior de productividad de las granjas, que aquellos sin disentería. Esta baja productividad se asoció a la alta mortalidad, baja ganancia diaria de peso, baja eficiencia alimenticia (o alta CA) y elevado porcentaje de animales sacrificados (Harms, 2011).

El grado de bioseguridad se correlacionó con la detección de *B. hyodysenteriae*, la mortalidad y la GDP. La aplicación de normas de bioseguridad es de real importancia para

cuidar el estatus sanitario de una granja y prevenir el ingreso de enfermedades (Laanen y col., 2013). Los veterinarios de las granjas 6 y 7 habían detectado falencias graves en la bioseguridad, tales como el contacto de operarios con el camión de carga (con cerdos de otros criaderos). Las escasas medidas internas asociadas al flujo continuo, único sitio de producción, la falta de vaciado de fosas, las aguas servidas entre galpones, operario único en recría y engorde, permitirían una rápida difusión y persistencia de la enfermedad en dichas granjas. Un estudio de bioseguridad realizado sobre 95 granjas, indicó que la bioseguridad se implementa mejor en las granjas grandes, con instalaciones modernas y con propietarios jóvenes (Laanen y col., 2013). En este sentido, *B. hyodysenteriae*, se identificó en las granjas más pequeñas del estudio y de flujo continuo, las cuales frecuentemente presentan menores medidas de bioseguridad.

La bioseguridad presentó correlación positiva con la GDP y negativa con la tasa de mortalidad de la recría, mostrando la estrecha relación entre las normas de bioseguridad, la mortalidad y la ganancia de peso de los cerdos. Esto tiene concordancia con lo encontrado por otros autores, quienes determinaron una correlación positiva entre el nivel de bioseguridad y la GDP y negativa con la tasa de conversión alimenticia y los tratamientos antibióticos (Laanen y col., 2013). Esto estaría relacionado a las mejores medidas de manejo, como el control de la reposición, la remoción de estiércol, las medidas de higiene y desinfección, las cuales disminuyen el riesgo de ingreso de agentes y la dispersión dentro de una granja y llevaría a una reducción de la presión de infección y del uso de antibióticos (Laanen y col., 2013). En la misma línea, en la granja 1 por ejemplo, a pesar de los niveles intermedios de detección de *L. intracellularis*, se lograron bajas tasas de mortalidad y alto peso en la salida de recría y de venta, con el gasto en antibiótico más bajo del estudio (\$ 13,6/ cerdo). Es evidente que el cuidado de la salud de los animales, asociado a las condiciones de higiene, manejo y bioseguridad, conlleva a mejores resultados productivos

aun en presencia de moderados niveles de agentes patógenos. Por lo tanto, las normas de bioseguridad son necesarias para lograr una producción animal sostenible y rentable en el tiempo.

Algunos autores plantean que las infecciones entéricas ocurren más a menudo en granjas de gran tamaño, mientras que en otros estudios esta asociación no se pudo demostrar (Viott y col., 2013; Suh y Song, 2005; Dors y col., 2015). En nuestro estudio no se encontró relación entre la presencia de enteropatógenos y el número de madres o número de sitios, posiblemente debido al bajo número de granjas evaluadas.

b. Pérdida económica asociada a enteropatía porcina y disentería porcina

La magnitud de las pérdidas económicas asociadas a enfermedades varía entre granjas y depende de los gastos destinados al tratamiento y a la prevención que llevarán a un aumento o disminución del costo total de una enfermedad. Una verdadera estimación del costo debe tener en cuenta todos los impactos que produce la enfermedad tanto productivos como ambientales, lo cuales son muy difíciles de medir (Bennett y col., 1999). El efecto sobre la salud humana, el bienestar animal o la contaminación del medio ambiente no tienen valores explícitos en precios del mercado y pueden representar “costos ocultos” no incluidos (Bennett y col., 1999). En nuestro estudio, para calcular el costo económico directo se consideraron la pérdida productiva asociada a la disminución en la GDP y los gastos de medicación. Otros parámetros, tales como la tasa de conversión, costos de alojamiento, variación de peso a la faena y deposición grasa, entre otros, no se tuvieron en cuenta en nuestro estudio ya que son muy difíciles de asociar a un agente en particular en condiciones de campo. Por otra parte, varios de estos parámetros no fueron calculados en muchas granjas. En las granjas donde solo se detectó *L. intracellularis* la estimación de pérdidas mínimas por cerdo fue de entre \$19,1 a \$39,9 y las pérdidas máximas entre \$29,8 a \$69,9, las cuales corresponden a 1,8 y

3,8 kg de cerdo perdidos como mínimo y 2,8 y 6,7 kg de cerdos perdidos como máximo. Si bien las comparaciones en estos tipos de estudios son difíciles de hacer, los valores reportados en otras partes del mundo son similares a los estimados por nosotros (McOrist y col., 1997; Paradis y col., 2005). En las granjas con ocurrencia conjunta de EPP y DP, los costos totales mínimos y máximos por cerdo engordado fueron de \$ 40,7 y \$61,5 en la granja 6, correspondiente a 3,9 y 5,9 kg de cerdo y de \$55,6 y \$71,6 en la granja 7, lo que representa entre 5,3 y 6,9 kg de cerdo. Está claro que la presencia de dos entidades simultáneas perjudica notablemente la economía de un establecimiento, representando casi el doble en las pérdidas si se las compara con los demás establecimientos. En las granjas 6 y 7, los gastos en antibióticos, en particular en aquellos dirigidos a controlar el cuadro de disentería, fueron los más elevados del estudio. Otros autores indican que los gastos en antibióticos para tratar y prevenir DP son muy elevados y arrojan pérdidas millonarias anuales (Hampson y col., 2006; Hampson, 2012). El costo de los medicamentos, la recurrencia de la enfermedad en una granja, el control incompleto de la enfermedad clínica, así como el riesgo de transmisión de la infección a explotaciones vecinas, hacen que la erradicación de la enfermedad sea la mejor alternativa (Harms, 2011).

iii. Conclusiones

1. La presencia de *B. hyodysenteriae* se asoció a granjas con mal desempeño productivo, baja bioseguridad, elevado porcentaje de diarrea y de mortalidad. Además los gastos asociados a la terapéutica, mortalidad y bajo peso de venta hacen de ella una enfermedad de gran impacto económico.
2. En las granjas evaluadas no se observó asociación entre el porcentaje de detección de *L. intracellularis*, *Salmonella* spp., porcentaje de mortalidad y GDP.
3. El cumplimiento de las normas de bioseguridad lleva a una mejora en los índices productivos y sanitarios, aún en presencia de detecciones moderadas de *L. intracellularis*.
4. Los gastos más elevados en antibióticos tuvieron lugar en aquellas granjas con cuadros clínicos de EPP y DP.
5. Según el cálculo económico teórico realizado, la presentación subclínica de EPP no debería ser subestimada ya que existe un costo económico asociado.

6. Conclusiones generales

1. *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, y *Salmonella* spp. son frecuentes en la etapa de crecimiento y terminación, tanto en casos de archivos como en las granjas evaluadas, y tienen una participación relevante en el desarrollo de cuadros clínicos y subclínicos.
2. Se detectó asociación estadística entre las lesiones histopatológicas, en particular la hiperplasia de los enterocitos inmaduros de la cripta, la necrosis profunda de la mucosa y la hiperplasia de las células caliciformes, con la detección de *L. intracellularis*, *Salmonella* spp. y *Brachyspira* spp., respectivamente.
3. La técnica de PCR de TEP es una herramienta que, en determinadas situaciones, puede ser utilizada como complemento para la asociación etiológica en material de archivo y de diagnóstico.
4. *Lawsonia intracellularis* fue el agente más frecuentemente detectado en este estudio, tanto de animales con y sin lesiones, como en aquellos con y sin diarrea. El riesgo de detección aumentó con el grado de diarrea y la edad de los cerdos.
5. La presentación subclínica de EPP fue muy frecuente tanto a nivel individual (10 % de cerdos sin diarrea) como en lotes (55 %) y en granjas (6/8).
6. *Salmonella* spp. se detectó en 5/8 granjas en animales con y sin diarrea y la edad de máxima detección fue la previa a la faena, lo que representa un riesgo para la salud pública, más aún si consideramos la detección de una cepa monofásica de *S. Typhimurium*.
7. Se detectó *B. hyodysenteriae* solamente en cerdos con diarrea, y su presencia se asoció con mal desempeño productivo, baja bioseguridad, elevado porcentaje de

diarrea y de mortalidad. El costo de antibióticos en esas granjas fueron los más elevados.

8. Según la estimación económica realizada, la presencia de *Lawsonia intracellularis* y *Brachyspira hyodysenteriae*, impactan negativamente en la economía de las granjas.
9. Se detecto una relación entre las buenas medidas de bioseguridad, altas GDP y menor mortalidad, aún en presencia de detecciones moderadas de *L. intracellularis*.
10. Las infecciones mixtas resultaron más frecuentes a nivel granja que a nivel individual. En el nivel individual se observó principalmente en animales hallados muertos

7. Anexo

Planilla 1. Encuesta realizada en cada establecimiento *ad- hoc*. Resumen de las normas de bioseguridad más importantes de las granjas evaluadas.

Bioseguridad	Granja 1	Granja 2	Granja 3	Granja 4	Granja 5	Granja 6	Granja 7	Granja 8
Alambrado periférico	Si	No	Si	Si	Si	Si	No	Si
Rodaluvio	Si	No	No	No	Si	No	No	Si
Lavador de chasis	Si	No	No	No	No	No	No	No
Camión de carga compartido	No	No	No	No	No	Si	Si	No
Cuarentena	Si	No	No	No	No	No	No	No
Ingreso de vehículos	Propios	Propios	Propios	Propios	Propios	Visitas, propio	Visitas, propios	Propios
Personal exclusivo por sectores	Si	No	Si	Si	Si	No	No	Si
Pediluvios en entrada de galpones	No	Si	No	Si	No	No	Si	No
Pediluvios entrada de las salas	Si	Si	No	Si	No	No	No	Si
Almacenamiento cadáveres*	Pozo a 300 m	Pozo 300 m	Compost	Pozo a 100 m	Pozo a 200 m	Pozo a 200 m	Aire libre a 300 m	Pozo a 500 m
Limpieza con agua fría	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Limpieza con agua caliente	No	No	No	No	No	No	No	No
Días de vacío sanitario	5	7	5 a 7	1	5 a 7	0	N/E	5
Uso de desinfectante	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Vaciado de las fosas	Parcial	Total	Total	Total	Total	Parcial	Parcial en recría y nunca en engorde	Total
Frecuencia de vaciado*	3 días	15 días	10 días	50 días	Salida del lote	N/E	Nunca	30 días
Defensa contra pájaros	Si	Mal estado	Si	Si	Si	No	No	Mal estado
Control de roedores	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Edades por galpón	Una	Dos	Una	Dos	Una	Varias	Varias	Una
Otras especies en las granja	No	Perros	Gto, Bv, Eq	Gto	No	Eq, perros	Perros	Perros
Ingreso de otras especies a los galpones	No	No	No	Palomas	No	Perros	Perros	Palomas

*No se utilizaron para la puntuación de bioseguridad. N/E: no establecido; Gto: gato; Bv. Bovino; Eq: equino

Planilla 2: Cálculo de la bioseguridad de cada granja.

Bioseguridad	Granja 1	Granja 2	Granja 3	Granja 4	Granja 5	Granja 6	Granja 7	Granja 8
Alambrado periférico	1	0	1	1	1	1	0	1
Rodaluvio	1	0	0	0	1	0	0	1
Lavador de chasis	1	0	0	0	0	0	0	0
Camión de carga compartido	1	1	1	1	1	0	0	1
Cuarentena	1	0	0	0	0	0	0	0
Ingreso de vehículos	1	1	1	1	1	0	0	1
Personal exclusivo por sectores	1	0	1	1	1	0	0	1
Pediluvios en la entrada de los galpones	0	1	0	1	0	0	1	0
Pediluvios a la entrada de las salas	1	1	0	1	0	0	0	1
Limpieza con agua fría	0	0	0	0	0	0	0	0
Limpieza con agua caliente	0	0	0	0	0	0	0	0
Días entre la limpieza y la entrada de animales	1	1	1	0	1	0	0	1
Uso de desinfectante	1	1	1	1	1	1	1	1
Vaciado de las fosas	0	1	1	1	1	0	0	1
Defensa contra pájaros	1	0	1	1	1	0	0	0
Control de roedores	1	1	1	1	1	1	1	1
Más de una edad por galpón	1	1	1	1	1	0	0	1
Otras especies en las granja	1	0	0	0	1	0	0	0
Ingreso de otras especies a los galpones	1	1	1	0	1	0	0	0
Total	15	10	11	11	13	3	3	11
Puntaje de bioseguridad	3	2	3	3	3	1	1	3

1=cuando la medida de bioseguridad es apropiada; 0=medida de bioseguridad no realizada o insuficiente

Planilla 3. Cálculo de gasto en antibióticos según semana de vida utilizad en cada granja

Granja	Semana de vida	Precio (\$)/ animal	Droga utilizada	\$Total/ granja
Granja 8	11	3,7	Tiamulina/ clortetraciclina	25,5
	12	4,3	Tiamulina/clortetraciclina	
	16	2,2	Norfloxacina	
	17	6,1	Tiamulina/clortetraciclina	
	18	6,4	Tiamulina/clortetraciclina	
	19	2,8	Norfloxacina	
Granja 7	7	6,5	Tiamulina	52
	8	8,0	Tiamulina	
	14	9,1	Tiamulina	
	16	11,3	Tiamulina	
	19	8,2	Tiamulina	
	20	8,9	Tiamulina	
Granja 6	10	1,8	Lincomicina	34,5
	11	2,1	Lincomicina	
	14	3,3	Lincomicina	
	15	3,7	Lincomicina	
	18	4,9	Lincomicina	
	19	5,3	Lincomicina	
	22	6,5	Lincomicina	
	23	6,9	Lincomicina	
Granja 5	8	1,2	Amoxicilina	15,9
	9	1,4	Amoxicilina	
	16	6,3	Amoxicilina	
	17	7,0	Amoxicilina	
Granja 4	5	0,7	Amoxicilina	26,3
	12	3,9	Tiamulina	
	13	4,5	Tiamulina	
	19	8,2	Tiamulina	
	20	8,9	Tiamulina	
Granja 3	5	1,0	Amoxicilina	37,3
	10	1,7	Amoxicilina	
	12	2,3	Amoxicilina	
	10	2,4	Tiamulina/clortetraciclina	
	11	2,8	Tiamulina/clortetraciclina	
	16	5,3	Tiamulina/clortetraciclina	
	17	5,8	Tiamulina/clortetraciclina	
	Granja 2	7	1,4	
10		2,0	Amoxicilina	
13		4,5	Tiamulina	
14		5,1	Tiamulina	
15		5,7	Tiamulina	
18		4,9	Clotetraciclina/tilosina	
19		5,3	Clotetraciclina/tilosina	
Granja 1	8	1,2	Amoxicilina	24,6
	9	1,4	Amoxicilina	
	16	5,3	Tiamulina/clortetraciclina	
	17	5,8	Tiamulina/clortetraciclina	

8. Bibliografía

- Alban L, Stege H, Dahl J. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. *Prev Vet Med.* 2002; 53:133-46.
- Alban L, Baptista F, Møgelmoose V, Sørensen L, Christensen H, Aabo S, Dahl J. *Salmonella* surveillance and control for finisher pigs and pork in Denmark—A case study. *Food Research International.* 2012; 45:656–665.
- Allan G, Meehan B, Todd D, Kennedy S, McNeilly F, Ellis J Clark E, Harding J, Espuna E, Charreyre C. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet. Rec.* 1998; 142: 467-468.
- Anónimo. IOWA PORK. In: *Bloody Scours (Swine Dysentery)*. Ed. Producers Association. University Extension. Iowa State University. 2013
- Anónimo. *Manual Nutricional de Desempeño*. Choice Genetic. Ed. 2014.
- Baccaro MA, Moreno MA, Shinya T, Dotto D. Identification of bacterial of enteric diseases by PCR in growing-finishing pigs. *Braz. J. Microbiol.* 2003; 34: 225-229.
- Barcellos DE, Mathiesen M. R, De Uzeda M, Kader T. A, Duhamel G. E. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Vet Rec.* 2000; 146: 398-403.
- Barcellos DE, Razia LE, Borowski SM. Ocorrência e identificação de espiroquetas intestinais em suínos em granjas de porte industrial de duas regiões criatórias do estado do Rio Grande do Sul, em relação à medicação da ração. *Ciência Rural, Santa Maria.* 2003; 33 (4):725-729.
- Barcellos DE, de Souza R, de Oliveira Filho J, Borowski S. Caused by infection with *Brachyspira* spp. in pigs. *Acta Sci Vet.* 2010; 38: 229-245.

- Batte EG, McLamb RD, Muse KE, Tally SD, Vestal TJ. Pathophysiology of Swine Trichuriasis. *Am J Vet Res.* 1997; 38:1075-1079.
- Bearson SM, Allen HK, Bearson BL, Looft T, Brunelle BW, Kich JD, Tuggle CK, Bayles DO, Alt D, Levine UY, Stanton TB. Profiling the gastrointestinal microbiota in response to *Salmonella*: low versus high *Salmonella* shedding in the natural porcine host. *Infect Genet Evol.* 2013; 16: 330-40.
- Beloeil P, Chauvin C, Proux K, Madec F, Fravallo P, Alioum A. Impact of the *Salmonella* status of market-age pigs and the pre-slaughter process on *Salmonella* caecal contamination at slaughter. *Vet Res.* 2004; 35(5):513-530.
- Bennett R, Christiansen K, Clifton-Hadley R. Preliminary estimates of the direct costs associated with endemic diseases of livestock in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine.* 1999; 39:155-171.
- Bertone J. Determinación y caracterización de la enteritis proliferativa porcina en criaderos confinados de la Argentina. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Rio Cuarto. 2012.
- Beloeil PA, Fravallo P, Fablet C, Jolly JP, Eveno E, Hascoet Y, Chauvin C, Salvat G. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. *Madec F Prev Vet Med.* 2004; 63(1-2):103-20.
- Biksi I, Lorincz M, Molnár B, Kecskés T, Takács N, Mirt D, Cizek A, Pejsak Z, Martineau GP, Sevin JL, Szenci O. Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs. *Acta Vet Hungary.* 2007; 55:219-127.
- Brandt D, Kaim U, Baumgartner W, Wendt M. Evaluation of *Lawsonia intracellularis* infection in a group of pigs in a subclinically affected herd from weaning to slaughter. *Vet Microbiol.* 2010; 146: 361–365.

- Burch D. Controlling diarrhoea in growing pigs – the grey scour syndrome. Pig Journal, Inglaterra, 2000; 45:131-149.
- Burrough ER. Swine Dysentery: Etiopathogenesis and Diagnosis of a Reemerging Disease. Veterinary Pathology. 2016; as doi: 10.1177/0300985816653795.
- Bustamante J, Astudillo B, Pazos A, Bravo L. Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no óptimas. Acta biol Colomb. 2011; 16:83-98.
- Caffer M. Diagnostico bacteriológico, patógenesis y serovariedades prevalentes de *Salmonella* spp. en Argentina. V cursillo de actualización sobre enfermedades emergentes del cerdo. La Plata. 2007; p 35-44.
- Carlson SA, Barnhill AE, Griffith RW. Salmonellosis. En: Diseases of Swine. 2012. 10th Ed., Iowa, USA. Jeffrey J. Zimmerman. p 821-840.
- Caravajal A, de Arriba ML, Pozo J, Vidal A, Rubio P. Diagnóstico diferencial de las enfermedades digestivas del cerdo. Sitio Argentino de Producción Animal. 2011.
- Carranza A, Parada J, Flores León M, Tamiozzo P, Camacho P, Di Cola G, Busso JJ. *Brachyspira* spp. identificadas en cerdos en terminación de granjas confinadas. Congreso Nacional de producción Porcina, 2014. Resumen S4. Mar del Plata, Argentina.
- Chávez F, Pérez EM, H Barrales, Zignago F, M Lozada, MA Quiroga, M Machuca, J Cappuccio, C Perfumo. Análisis de los cuadros entéricos en cerdos remitidos al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria (año 2013). XII Congreso Nacional de Producción Porcina. 2014. Mar del Plata. Argentina.
- Collins A, Love R, Jasni S, McOrist S. Attempted infection of mice, rats and chickens by porcine strains of *Lawsonia intracellularis*. Australian Veterinary Journal. 1997; 7: 120–122.

- Collins AM, Love RJ, Pozo J, Smith SH, McOrist S. Studies on the ex vivo survival of *Lawsonia intracellularis*. J Swine Health Prod. 2000; 8: 211-215.
- Collins A. Advances in Ileitis Control, Diagnosis, Epidemiology and the economic Impacts of Disease in Commercial Pig Herds. Agriculture 2013; 3: 536-555.
- Correia-Gomes C, Mendonça D, Vieira-Pinto M, Niza-Ribeiro J. Risk factors for *Salmonella* spp. in Portuguese breeding pigs using a multilevel analysis. Prev Vet Med. 2013; 108:159-166.
- de Souza Daniel A, Resende T, Sato J, Guedes R. Infeccion por *Brachyspira* spp. em suínos no Brasil. Guia Guessulli da avicultura e Suinocultura Industrial. 2013: 52-58.
- Dors A, Pomorska-Mól M, Czyżewska E, Wasyl D, Pejsak Z. Prevalence and risk factors for *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. in finishing pigs in Polish farrow-to-finish swine herds. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2015; 18 (4): 825–831.
- Duhamel E, Mathiesen M. A Population Approach to Diagnosis of Grow-Finish Diarrhea Complex. Nebraska Swine Reports. 1999; 128:10-12.
- Duhamel G. Comparative pathology and pathogenesis of naturally acquired and experimentally induced colonic spirochetosis. Anim Health Res Rev. 2001; 2(1); 3-17.
- Duff JW, Pittman JS, Hammer JM, Kinyon J. Prevalence of *Brachyspira hyodysenteriae* in sows and suckling pigs. Swine Health Prod. 2014; 22(2):71–77.
- Echeita MA, Herrera S, Simón C. Gastroenteritis invasivas, ¿algo nuevo? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29:55-60.
- Elder R, Duhamel G, Mathiesen M, Erickson E, Gebhart C, Oberst R. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, and salmonellae in porcine intestinal specimens. J Vet Diagn Invest. 1997; 9: 281-286.

- Fosse J, Seegers H, Magras C. Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review. *Zoonoses Public Health*. 2009; 56: 429–454.
- Friedman M, Bednar V, Klimes J, Mrlik V, Literák L. *Lawsonia intracellularis* from pig farms with the occurrence of porcine proliferative enteropathy. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008; 47: 117–121.
- Funck J. Phe-harvest food safety diagnostics for Salmonella serovars. Part 1: Microbiological culture. *Journal of Swine Health Production*. 2003; 11: 246-251.
- Gebhart CJ, Guedes RM. Proliferative enteropathy: diagnostics and immunity. En: *Proceeding of American Association of Swine Veterinarians*. 2001; p353-357. USA.
- Giacoboni G. Susceptibilidad de diferentes cepas de ratones libres de patógenos específicos a la infección experimental con *Serpulina hyodysenteriae* agente productor de la disentería porcina. Tesis doctoral. Universidad nacional de la Plata. 1998.
- Guedes RM, Gebhart CJ, Armbruster GA, Roggow BD. Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative hemorrhagic enteropathy. *Can J Vet Res* 2002; 66: 258-263.
- Guedes RM, Winkelman NL, Gebhart CJ. Relationship between the severity of porcine proliferative enteropathy and infectious dose of *Lawsonia intracellularis*. *Vet Rec* 2003; 153; 432-433.
- Guedes RM, Gebhart CJ. Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs alter challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Vet Microbiol.* 2003; 91: 135-45.
- Guedes RM. Update on epidemiology and diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *J Swine Health Prod.* 2004; 12: 134-138.

- Guedes RM, Viott A, Cruz Jr. Estudos recentes com enteropatógenos de suínos no Brasil. *Revista Porcicultura Iberoamericana*. 2011; 2: 3-9.
- Guenther S, Filter M, Tedin K, Szab I, Wieler L, Nöckler K, Walk N, Schierack P. Enterobacteriaceae populations during experimental *Salmonella* infection in pigs. *Veterinary Microbiology*. 2010; 142: 352–360.
- Guerra B, Laconcha I, Soto SM, González-Hevia MA, Mendoza MC. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol Lett*. 2000; 190: 341-347.
- Guerrant R, Holames R, Robertson C, Greenberg R. Roles of enterotoxins in the pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. En: *Microbiology*. Washington, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1985; p 68-73.
- Griffith RW, Schwartz KJ, Meyerholz DK. Salmonella. En: *Diseases of Swine*, 9th Edition. Ed., Blackwell Publishing, Ames, Iowa USA, 2006; p 739-754.
- Grutzner N, Gebhart C, Lawhorn B, Suchodolski J, Steiner J. Serum folate, cobalamin, homocysteine and methylmalonic acid concentrations in pigs with acute, chronic or subclinical *Lawsonia intracellularis* infection. *Vet J*. 2015; 203: 320–325.
- Hampson DJ, Fellstrom C, Thompson JR. Swine Dysentery. En: *Diseases of Swine*. 9^a Ed., Blackwell Publishing, Ames, Iowa USA, 2006; p 705–806.
- Hampson DJ. Brachyspiral colitis. En: *Diseases of Swine*. 2012. 10th Ed., Iowa, USA. Jeffrey J. Zimmerman. p 680–696.
- Harms P. Practitioner experiences with swine dysentery. *American Association of Swine Veterinarians*. 2011. USA.
- Hauser H, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Blank K, Prager R, Rabsch W, Appel B, Fruth A, Malorny A. Pork Contaminated with *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:-, an Emerging Health Risk for Humans. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76: 4601–4610.

- Huerta B, Arenas A, Carrasco L, Maldonado A, Tarradas C, Carbonero, y col. Comparison of diagnostic for porcine proliferative enteropathy (*Lawsonia intracellularis* infection). J Comp Path. 2003; 129: 179-185.
- Huijsmans C, Damen J, Linden J, Savelkoul P, Hermans M. Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues: effect on downstream molecular applications. BMC Research. 2010; 3: 239-248.
- Ibar M, Vigo G, Piñeyro P, Caffer M, Quiroga M, Perfumo C, Centrón D, Giacoboni G. Serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie enterica en porcinos de faena y su resistencia a los antimicrobianos. Rev Asoc Argent Microbiol. 2009; 41: 156-162.
- Illanes N, Pereyra N, Carranza A, Pelliza B, Ambrogi R, Tamiozzo P, Ambrogi A. Presencia de *Brachyspira hyodysenteriae* y pilosicoli en argentina. Memorias del IX Congreso Nacional de Producción Porcina, 2008. San Luis, Argentina; p 198.
- Jacobson M, Fellström C, Heldtander M, Gunnarsson A. The prevalence of *Lawsonia intracellularis* in Swedish pigs submitted for autopsy. Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress, 2000. Melbourne, Australia, p.74.
- Jacobson M, Hard af Segerstad C, Gunnarsson A, Fellstroem C, de Verdier Klingenberg K, Wallgren P, Jensen M. Diarrhoea in the growing pig-a comparison of clinical morphological and microbial finding between animals from good and poor performance herds. Res Vet Sci. 2003; 74: 163-169.
- Jacobson M, Gerth Löfstedt M, Holmgren N, Lundeheim N, Fellström C. The prevalence of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish swine herds and in the wild boar population. J Vet Med. 2005; 52: 386–391.
- 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.

- Jensen T. Diarrhea how slagtesvin. Pato Anatomiske studier over colitis. (Patho-anatomical studies on colitis). Thesis. Copenhagen: The Royal Veterinary and Agricultural University, Institution for Pharmacology and Pathology. 1995.
- Jensen T, Møller TD, Leser SE, Jorsal SE. Comparison of histology, immunohistochemistry and polymerase reaction for detection of *Lawsonia intracellularis* in natural porcine proliferative enteropathy. *Europ J Vet Path.* 1997; 3: 115-123.
- Jensen T, Møller T, Boyme, Leser T, And Jorsal S. Scanning Electron Microscopy and Fluorescent In Situ Hybridization of experimental *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* infection in Growing Pigs. *Vet Pathol.* 2000; 37:22–32.
- Jensen T, Vigre H, Sørensen V, Møller V. Naturally acquired *Lawsonia intracellularis* infection in pigs studied from weaning to slaughter by indirect immunofluorescence antibody test and polymerase chain reaction on faeces. *Res Sci.* 2005; 79: 93–98.
- Jensen T, Vigre H, Svensmark B, Bille-Hansen V. Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia ontracellularis*. *J Comp Pathol.* 2006; 135: 176-183.
- Johnston T, Deweu C, Friendship M, Smart N, McEwen B, Stalker M, de Lange C. An intestigation of the etiology of mild diarrhea observed in a grower/finisher pigs. *Can Vet J.* 2001; 42: 33-37.
- Jones G, Ward E, Murtaugh M, Lin G, Gebhart C. Enhanced Detection of Intracellular Organism of Swine Proliferative Enteritis, *Ileal Symbiont Intracellularis*, in Feces by Polymerase Chain Reaction. *Journal of clinical.* 1993; 31: 2611-2615.
- Kranker S, Alban L, Boes J, Dahl J. Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:2282-8.

- Krol JJ, Roof M.B, McOrist S. Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*. Am J Vet Res. 2004; 65: 559–565.
- La T, Collins AM, Phillips ND, Oksa A, Hampson DJ. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. Lett Appl Microbiol. 2006; 42, 284–288.
- Laanen M, Persoons D, Ribbens S, de Jong E, Callens B, Strubbe M, Maes D, Dewulf J. Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. Vet J. 2013; 198: 508–512.
- Ladinig A, Sommerfeld-Stur I, and Weissenbo ck H. Comparative Evaluation of Diagnostic Methods for *Lawsonia intracellularis* Infection in Pigs, with Emphasis on Cases Lacking Characteristic Lesions. Comp Path. 2009; 140: 140-148.
- Lawson GHK, McOris S, Sabri J, Mackie RA. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: Cultivation and maintenance in vitro. J Clin Microbiol. 1993; 31: 1136-1142.
- Lawson G, Gebhart CJ. Proliferative enteropathy. J Comp Path. 2000; 122: 77-100.
- Love R, Love D. Control of proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. Vet Rec. 1977, 100, 473.
- Machuca M. Enteropatía proliferativa porcina: determinación de anticuerpos para *Lawsonia intracellularis* y estudios anatomopatológicos. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. 2007.
- Machuca M, Quiroga MA, Cappucio J, Piñeyro P, Weber N, Alarcón L, Perfumo J. Identificación Inmunohistoquímica de Circovirus Porcino tipo 2 y *Lawsonia intracellularis* en Muestras de Ileon de Cerdos con Lesiones de Enteropatía

Proliferativa Porcina. 2008. IX Congreso Nacional de Producción Porcina. Potrero de Los Funes, San Luis, Argentina. p 203.

- Machuca M, Cappuccio J, Piñeyro P, Venturini M, Quiroga MA, Perfumo J. Serological and Histopathological survey of *Lawsonia intracellularis* Infection in 30 Argentinean Swine Herds. Braz J Vet Pathol. 2009; 2: 8-11.
- Machuca M, Cappuccio J, Quiroga M, Insarralde L, Cáncer J, Arrospide S, Perfumo C. Granulomatous enteritis associated with porcine proliferative enteropathy. Braz J Vet Pathol. 2012; 5(1): 25 – 30.
- Mauch CH, Bilkei G. Reproductive performance of gilts following an outbreak of acute proliferative enteropathy due to *Lawsonia intracellularis*. Vet J. 2005; 170: 128-131.
- McOrist S, Jasni S, Mackie RA, MacIntyre N, Neef N, Lawson GHK. Reproduction of porcine enteropathy with pure cultures of ileal symbiont intracellularis. Infec Immunol. 1993; 61: 4286-4292.
- McOrist S, Gebhart CJ, Boid R, Barns SM. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov, sp nov, the obligate intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45: 520-525.
- McOrist S, Jasni S, Mackie RA, Berschneider HM, Rowland AC, Lawson GHK. Entry and release of the bacterium ileal symbiont intracellularis in cultured enterocytes. Res Vet Sci. 1995; 59:255-260.
- McOrist S, Roberts L, Jasni S, Rowland AC, Lawson GH, Gebhart CJ, Bosworth B. Developed and resolving lesion in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. J Comp Path. 1996; 115: 35-45.
- McOrist S, Smith H, Green L. Estimate of direct financial losses due to porcine proliferative enteropathy. Vet Rec. 1997; 140: 579-581.

- McOrist S. Defining the full costs of endemic porcine proliferative enteropathy. *Vet J.* 2005; 170: 8–9.
- McOrist, S., Hardge, T., Gebhart C, Ohlinger, V., Pohlenz, J., Keller C, Voets, H., Walter, D. Porcine proliferative enteropathy – Ileitis. Technical Manual 3.0. Ed. Boehringer Ingelheim Animal Health GmbH, Rhein, Alemania. 2006.
- McOrist S, Gebhart CJ. Proliferative enteropathies. En: *Diseases of Swine*. 9th Ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 2006. p. 727-738.
- McOrist S, Smith R. Field evaluation of an oral attenuated *Lawsonia intracellularis* vaccine for porcine proliferative enteropathy (ileitis). *Vet Rec.* 2007; 161: 26-28.
- McOrist S, Gebhart C. Porcine Proliferative Enteropathies. *Diseases of Swine*. 2012. 10th Ed. Jeffrey J. Zimmerman. IOWA, USA, p811-820.
- Meyerholz DK, Stabel TJ, Ackerman MR, Carlson SA, Jones BD, Pohlenz J. Early epithelial invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in the swine ileum. *Vet Pathol.* 2002; 39: 712-720.
- Møller K, Jensen T, Jorsal S, Leser T, Carstensen B. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enteric* and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Vet Microbiol.* 1998; 62(1): 59-72.
- Moredo F, Giacoboni G, Perfumo JC, Mittal R. Serotipificación de cepas de *Serpulina hyodysenteriae* aislados en cerdos con cuadros de disentería porcina en la provincia de Buenos Aires. *Rev Latinoam Microbiol.* 1999; 41: 63-66.
- Morel Saives A, Le Pannerer X. Subclinical Ileitis: Prevalence and Impact in French Farms. Proceedings of: 20th International Pig Veterinary Society Congress. Durban, South Africa. 2008; 1: 153.

- Muirhead MR, Alexander TL. En: Managing Pig Health and the Treatment of Disease: A Reference for the Farm. Alexander T. editor. 1ra edición. Editorial Intermedica, Buenos Aires. 2001; 57-62.
- Nathues H, Oliveira C, Wurm M, Grosse Beilage E and Givisiez P. Simultaneous Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in Porcine Faeces and Tissue Samples by Multiplex-PCR. J Vet Med. 2007; 54: 532–538.
- Nathues C, Grüning P, Fruth A, Verspohl J, Blaha T, Kreienbrock L, Merle R, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella enteric* and their simultaneous occurrence in German fattening pig herds and their Environment. J Food Prot. 2013; 10: 1704-1711.
- Ochiai S, Adachi Y, Mori K. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* Comb. Nov., *Brachyspira innocens* Comb. Nov. and *Brachyspira pilosicoli* Comb. Nov. Microbiol Immunol. 1997;41 (6):445–452.
- Ordóñez A, Martínez-Lobo, Arguello H, Carvajal A and Rubio P. Swine Dysentery: Aetiology, Pathogenicity, Determinants of Transmission and the Fight against the Disease. Int J Environ Res Public Health. 2013; 10: 1927-1947.
- Parada J, Carranza A, Pelliza B, Tamiozzo P, Ambrogi A. Nivel de infección de *Salmonella* spp. en cerdos en argentina. X Congreso de producción porcina del Mercosur. Mendoza, 2010; p 263.
- Parada J, Carranza A, Pichel C, Tamiozzo P, Pelliza R, Ambrogi A. *Salmonella* transmission from the gilt to her offspring. Livest Sci. 2013; 157: 605–611.
- Parada J. Detección y caracterización de *Salmonella* en cerdos y su comparación con aislamientos en humanos en Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto. 2014.

- Paradis MA, McKay RI, Wilson JB, Vessie GH, Winkelman NL, Gebhart CJ. Subclinical Ileitis produced by sequential dilutions of *Lawsonia intracellularis* in a mucosal homogenate challenge model. Proc AASV. 2005;36; 189–192.
- Paradis MA, Gebhart CJ, Toole D. Subclinical ileitis: Diagnostic and performance parameters in a multi-dose mucosal homogenate challenge model. Journal of swine health and production. 2012; 20; 137-141.
- Park S, Lee J, Kim K, Yu-Sik Oh, Man-Ok Kim, Yu-Ri Oh, Hwang M, Lee J, Lee S. Efficacy of a commercial live attenuated *Lawsonia intracellularis* vaccine in a large scale field trial in Korea. Clin Exp Vaccine Res. 2013; 2: 135-139.
- Pedersen K, Holyoake P, Stege H, Nielsen J. Diagnostic Performance of Different Fecal *Lawsonia intracellularis* Specific Polymerase Chain Reaction Assays as Diagnostic Tests for Proliferative Enteropathy in Pigs: A Review. J Vet Diagn Invest. 2010; 22: 487.
- Pedersen KS, Stahl M, Guedes R, Angen O, Nielsen J, Jensen N. Association between faecal load of *Lawsonia intracellularis* and pathological findings of proliferative enteropathy in pigs with diarrhoea. BMC Vet Res 2012; 8:198.
- Pedersen K, Skrubel R, Stege H, Angen O, Stahl M, Hjulsager C, Larsen L, Nielsen J. Association between average daily gain, faecal dry matter content and concentration of *Lawsonia intracellularis* in faeces. Acta Veterinaria Scandinavica. 2012, 54:58.
- Pedersen K, Johansen M, Angen O, Jorsal SE, Nielsen JP, Jensen TK, Guedes R, Stahl M, Bækbo P. Herd diagnosis of low pathogen diarrhoea in growing pigs - a pilot study. Vet J. 2014;67(1):24.
- Pereda A, Piñeyro P, Bratanich A, Quiroga MA, Bucafusco D, Craig M, Cappuccio J, Machuca M, Rimondi M, Dibárbora M, Sanguinetti H, Perfumo C. Genetic

Characterization of Porcine Circovirus Type 2 from Pigs with Porcine Circovirus Associated Diseases in Argentina. ISRN Veterinary Science. 2011:560905.

- Perfumo, C. J. Muestras y muestreo en sanidad porcina: ¿cuándo, cómo y por qué hacerlo? En: Memorias del VII Congreso Nacional de Producción Porcina, Río Cuarto, Córdoba, Argentina, pp. 131-134, octubre de 2003.
- Pires A, Funk J, Bolin C. Longitudinal study of Salmonella shedding in naturally infected finishing pigs. Epidemiol Infect. 2013; 141: 1928–1936.
- Quiroga M.; Machuca M. Cappuccio J, Perfumo C. Tipo y envío de muestras en sanidad porcina. Curso de Enfermedades emergentes y Re-enfermedades de los cerdos. 2013. p 17-31.
- Rajic A, Keenlside J, McFall M, Deckert A, Mucckle A, Connor B, Manninen K, Dewey C, McEwen S. Longitudinal study of Salmonella species in 90 Alberta swine finishing farms. Vet Microbiol. 2005; 105: 47-56.
- Råsbäck T, Fellström C, Gunnarsson A, Aspán A. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. J Microbiol Methods. 2006; 66: 347–353.
- Reed WM, Olander HJ, Thacker HL. Studies on the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Choleraesuis var. Kunzendorf infection in weaning pigs. Am J Vet Res. 1986; 47:75-83.
- Reiner G, Hillen S, Von Berg S, Kixmüller M, Willems H. Analysis of bacterial load and prevalence of mixed infections with *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and/ or *Brachyspira pilosicoli* in German pigs with diarrhea. Eur J Wildl Res. 2011; 124: 236-241.
- Resende T, Real Pereira C, Gabardo M, João Paulo Amaral Haddad, Zélia Inês Portela Lobato, Guedes R. Serological profile, seroprevalence and risk factors related

to *Lawsonia intracellularis* infection in swine herds from Minas Gerais State, Brazil. Vet Res. 2015; 11: 306.

- Ross P, Sanz M, Sernia C, Bustos J, Sanguinetti HR, Risso MA. Causes of death in growing and fattening pigs in a farrow-to-finishing operation. Evaluation of their prevalence. Proceedings Annual Meeting American Association of Swine Practitioners, Indianapolis, Indiana USA. 2000; 61-69.
- Rostagno M, Hurd H, McKean J. Variation of bacteriologic and serologic *Salmonella enterica* prevalence between cohorts within finishing swine production farms. Food Res Int. 2012; 45: 867–870.
- Salmon D, Smith T. The bacterium of swine plague. American Monthly Microbiologic Journal. 1886; 7: 204.
- Scholz A, Nüske S, Kremery P, Förster M. Mayo de 2011. Efecto de la ileítis subclínica en los cerdos en crecimiento. Albeitar Pv. <http://albeitar.portalveterinaria.com>
- Schwartz K. Colitis in the grow-finish pig: diagnosis, control, elimination, and its effect on performance. Annual Meeting American Association of Swine Veterinarians. 2004. Proceedings p 515-542. Iowa, USA.
- Segalés J, Fernández-Salguero J, Fructuoso G, Quintana J, Rosell C, Pozo J, De Arriba MI, Rubio P, Domingo M. Granulomatous enteritis and lymphadenitis in Iberian pigs naturally infected with *Lawsonia intracellularis*. Vet. Pathol. 2001; 38: 343-346.
- Segalés J, Domingo M, Chianini F, Majó N, Domínguez J, Darwich L, Mateu E. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. Vet Microbiol. 2004; 98(2):151-8.
- Smith SH, McOrist S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. Res Vet Sci. 1997; 62: 6-10.

- Stege H, Jensen T, Møller K, Bækbo P & Jorsal S. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev Vet Med.* 2000; 46(4): 279-92.
- Stege H, Jensen T, Møller K, Vestergaard A, Bækbo P, Jorsal, S. Infection dynamics of *Lawsonia intracellularis* in Danish pig herds. *Vet Microbiol.* 2004; 104; 197-206.
- Stevenson GW. Differential diagnostic of diarrhea in grow-finish swine. Annual Meeting American Association of Swine Veterinarians. 2001, Proceedings p 359 USA.
- Stevenson GW. Diarrheal diseases in the post-weaned pig: salmonellosis and viral enteritis. Annual Meeting American Association of Swine Veterinarians. Proceedings p 527 – 531. 2004. USA.
- Suh D, Song J. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and Salmonella in swine herds. *J Vet Sci.* 2005; 6(4): 289–293.
- Song Y, La T, Phillips N, Hampson D. Development of a serological ELISA using a recombinant protein to identify pig herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet J.* 2015; 206: 365–370.
- Taylor DJ, Alexander TJ. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br Vet J.* 1971; 127(11):58–61.
- Taylor, D. J.; Simmons, J. R.; Laird, H. M. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Rec.* 1980; 106: 326-332.
- Thomson J, Smith W, Murray B McOrist S. Pathogenicity of three strains of *Serpulina pilosicoli* in pigs with a naturally acquired intestinal flora. *Infect Immun,* 1997; 5(9):3693.
- Thomson J, Friendship R. Digestive System. En: *Diseases of Swine.* 2012. 10th Ed., Iowa, USA. Jeffrey J. Zimmerman. p 199-226.

- Trott, L, Stanton D, Jensen N, Duhamel G, Johnson J, Hampson D. *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the Agent of Porcine Intestinal Spirochetosis. International Union of Microbiological Societies. 1996; 46: 206-215.
- Uzal F, Plattner BL, Hostetter JM. Alimentary System. En Jubb, Kennedy And Palmer. Ed. M. Grant Maxie. Pathology of Domestic Animals. Vol. 1. Elsevier, 2016, 6ta Edition. p 2-257.
- Vannucci FA, Borges EL, de Oliveira JS, et al. Intestinal absorption and histomorphometry of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Lawsonia intracellularis*. Vet Microbiol. 2010; 145: 286–291.
- Vannucci F, Gebhart CJ. Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* Infections. Vet Pathol. 2014; 51(2): 465-477.
- Vigre H, Larsen B, Andreasen M, Christensen J, Jorsal S. The effect of discontinued use of antimicrobial growth promoters on the risk of therapeutic antibiotic treatment in Danish farrow-to-finish pig farms. Epidemiol Infect. 2008; 136: 92–107.
- Vigo G, Moredo F, Cappuccio J, Piñeyro P, Caffer M, Salve A, Quiroga M, Pichel M, Perfumo C. Frecuencia, serovariedades y sensibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp., en cerdos faenados provenientes de una granja con presentación clínica de la infección. V Congreso de Producción Porcina Nacional. 2006. Córdoba, p 281.
- Vigo G, Capuccio J, Piñeyro P, Machuca M, Quiroga, MA, Moredo F, Perfumo C. Bacteriological and serological longitudinal study of *Salmonella enterica* in a positive three site farrow-to-finish farm. XIII Abraves, 2007. Florianópolis, Brasil.
- Vigo G, Cappuccio J, Piñeyro P, Salve A, Machuca M, Quiroga MA, Perfumo C. *Salmonella enterica* subclinical infection: bacteriological, serological, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance profiles-longitudinal study in a three-site farrow-to-finish farm. Foodborne Pathog Dis. 2009; 6:965-972.

- Viott A, Lage A, Cruz Junior E, Guedes R. The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds. *Braz J Microbiol.* 2013; 44:145-151.
- Weissenböck H, Maderner A, Herzog AM. Amplification and sequencing of *Brachyspira* spp. specific portions of *nox* using paraffinembedded tissue samples from clinical colitis in Austrian pigs shows frequent solitary presence of *Brachyspira murdochii*. *Vet Microbiol.* 2005; 111 (1–2):67–75.
- Westerman RB, Phillips RM, Joens LA, Westerman RB, Phillips RM, Joens LA. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for lipooligosaccharide of *Serpulina hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2145–2149.
- White A, Hansen-Lardy L, Brodersen B, Kelling CL, Hesse R and Duhamel G. Enhanced immunohistochemical detection of infectious agents in formalin-fixed, paraffin embedded tissues following heat mediated antigen retrieval. *J Vet Diagn Invest.* 1998; 10: 214–217.
- Winkelman N, Dee S. Ileitis: an update. *Compendium of Continuing Education of Practicing Veterinarians.* 1996; 18: 19–25.
- Winkelman N. Enteric clinical disease- “Back to the Basic”- Proceedings 28th Annual Meeting American Association of Swine Practitioners, Quebec City, Quebec, Canada. 1997; 353-358.