

CORRALES MORALES. JO

Características epid

2014

73997



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

**CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS, CLÍNICAS Y
PATOLÓGICAS DE *Lawsonia intracellularis* EN GRANJAS
PORCINAS DE ARGENTINA**

Trabajo de Tesis para optar al grado de Magister en Salud y Producción Porcina

Med. Vet. Johanna Paola Corrales Morales.

Director: M.V. MSc. Arnaldo Ambrogi

Co-directora: M.V. MSc. Bibiana R. Pelliza

MAYO 2014

5008

MFN:
Clasif:
T.964

“Los conceptos y opiniones vertidos en el texto publicado y del uso que otros puedan hacer de ellos son de exclusiva responsabilidad del autor. Dicha responsabilidad se asume con la sola impresión y presentación del trabajo de tesis ante el tribunal por el autor.”

Dedicatoria

***A mi Madre quien es el motor
de mi vida y lo más bello que
Dios me ha regalado.***

***A mi Padre que desde el cielo
siempre me acompaña, guía y
llena de bendiciones.***

***A mi Esposo quien es mi paz y
que con su amor y apoyo nunca
me dejó fracasar.***

***A mi Familia por su gran
confianza en mí e
incondicional apoyo.***

Agradecimientos

Los esfuerzos y trabajos que se generaron para el desarrollo de este trabajo no solo fueron hechos por parte del autor, sino de un grupo de personas que de una u otra forma aportaron su granito de arena para que este se hiciese realidad y a quienes no tengo más sino palabra de agradecimiento y mis mejores deseos para sus vidas.

Agradezco....

A Dios el haberme puesto este reto y lograr superarlo, pese a las dificultades, Él siempre me guió y fue la luz en mi camino.

A mis padres Marina y Toribio, quienes siempre confiaron en mí, todo lo que soy y tengo se lo debo a ellos. Gracias a su ejemplo y educación, por sus oraciones y bendiciones que nunca dejaron de faltar.

A mi esposo Bernardo, por su compañía, comprensión y aliento, por nunca dejar de insistir y así lograr culminar este gran paso.

A mi segunda mamita Josefina por sus especiales cuidados, apoyo y amor para conmigo.

A mi hermano y familia por su eterno apoyo y amor incondicional, pues pese a la distancia siempre estuvieron más cerca que nunca.

A la Universidad de Río Cuarto por darme la oportunidad de crecer profesionalmente, nunca olvidaré Creer, Crear, Crecer....

A mi Director el Dr. Arnaldo Ambrogi por enseñarme a “abrirme el cerebro” y aprender en cada instante, por su constante apoyo y paciencia.

A mi Co-Directora la Dra. Bibiana Pelliza por su contante alegría, su espíritu revolucionario, sus enseñanzas y apoyo profesional y personal.

A mi amigo el Dr. Pablo Tamiozzo por su noble e incondicional amistad y apoyo, a quien debo muchas alegrías y aprendizajes.

A los amigos y compañeros del grupo de porcinos, profesores de la UNRC y compañeros de camino Alicia Carranza, Silvia Romanini, Judith Bertone, Natalia Illanes, Mercedes Vásquez, Gabriel DiCola, Hernán Llovera, Roberto Ambrogi, Julián Parada e Ismael Dolso. Por su apoyo y constante aliento para el desarrollo y finalización de este trabajo, compañeros de viaje y contantes maestros.

A mis amigos Mónica Escalarea y Santiago Saldaño por su sincero e incondicional apoyo y amistad.

A mis evaluadores Jorge Brunori, Gabriel DiCola y Julián Parada por su comprensión y colaboración para la evaluación efectiva de este trabajo.

A todos por ser más que compañeros y amigos, son parte de mi familia.

Gracias Dios por estas maravillosas personas que pusiste en mi camino, mira con buenos ojos sus vidas e ilumina y llena de bendiciones su camino.

RESUMEN

Lawsonia intracellularis (*L. intracellularis*) es el agente causal de la enteritis proliferativa porcina (EPP), una enfermedad de alta prevalencia que se presenta en forma endémica en la mayoría de las granjas sean éstas confinadas o al aire libre, de alto o bajo nivel sanitario. Se reconocen actualmente tres formas clínicas de la enfermedad, aguda, crónica y subclínica, denominadas como enteritis proliferativa hemorrágica porcina la primera y EPP las dos últimas. El estudio de la forma subclínica representa el verdadero desafío en el diagnóstico, en el estudio de la dinámica de la enfermedad dentro de una piara en particular y en la evaluación del impacto del agente dentro del establecimiento.

El propósito del presente estudio fue determinar la presencia, distribución y perfil de *L. intracellularis* por medio de serología (enzimoinmunoensayo-ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en cerdos de distintas edades y determinar la presencia y dinámica de la diarrea y su asociación con *L. intracellularis* en granjas porcinas de la República Argentina, para lo cual se realizó un estudio de corte transversal, en 22 establecimientos de la zona de mayor producción porcina del país.

Se tomaron muestras de sangre y materia fecal de 10 cerdos de 8, 15 y 21 semanas de edad, para ELISA y PCR respectivamente. El 90,9% de las granjas fueron seropositivas, el 57% fueron PCR positivas. Además, los resultados de PCR, mostraron que para las 8, 15 y 21 semanas se encontraron 5, 21 y 30 muestras positivas en 3, 6 y 10 establecimientos respectivamente. Se concluyó que *L. intracellularis* está presente en forma endémica en el país y dentro de los establecimientos, que el mayor impacto de la enfermedad se da alrededor de las 15 semanas de edad, y que la utilización de ambas técnicas juntas en diferentes edades permite identificar la prevalencia de portadores/eliminadores y la prevalencia de la enfermedad, lo que facilitaría el desarrollo de protocolos de control y tratamiento para minimizar el impacto de la entidad clínico-patológica.

Para evaluar la presencia y dinámica de la diarrea y su asociación con *L. intracellularis* se desarrolló una encuesta en donde se evaluó la percepción del productor o persona a cargo de los porcinos sobre la presencia de diarreas en los animales de 8, 15 y 21 semanas de edad, así como un protocolo estandarizado para realizar la inspección y caracterización de las diarreas (color y consistencia), por parte de profesionales veterinarios. Se relacionó también la presencia de lesiones macroscópicas de íleon y válvula ileocecal con los resultados de PCR de tres cerdos piadosamente sacrificados y necropsiados en cada una de las granjas .

Se concluyó que la percepción de la diarrea por el productor en todas las edades (entre el 28,6% y el 38,1% de los establecimientos) fue menor a lo inspeccionado por los veterinarios (entre el 71,4% y el 90,5% de establecimientos). Independientemente de la edad, la diarrea que mayor frecuencia de presentación fue de consistencia cremosa y de color gris-verdoso. Si bien los factores causales de diarrea pueden originarse a partir de agentes infecciosos o no infecciosos y la presencia del signo clínico no puede relacionarse directamente con la presencia de *L. intracellularis*, es importante advertir que a las 15 semanas de edad se observó un mayor impacto del microorganismo dentro de las granjas, no solo por el tipo de diarrea sino también por la mayor percepción del evento y también por lo anteriormente citado en cuanto a las pruebas de laboratorio. En cuanto a la presencia de lesiones macroscópicas evaluadas en los animales necropsiados, se evidenció que los animales que fueron positivos a la prueba de PCR a *L. intracellularis* presentaron lesiones. Sin embargo, no todos los que presentaron lesiones fueron positivos a la PCR.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1. MÉTODOS DE ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DE <i>L. intracellularis</i>	4
1.1. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa	4
1.2. El uso de la serología	11
2. TÉCNICAS DE ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS	15
2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	15
2.2. Técnicas serológicas	19
3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	21
3.1. Características de las diarreas	21
3.2. Diarreas producidas por <i>L. intracellularis</i> .	22
3.2.1. Forma crónica	23
3.2.2. Forma subclínica	26
3.2.3. Forma aguda	27
4. HALLAZGOS PATOLÓGICOS MACROSCÓPICOS	30
4.1. Enteritis necrótica	31
4.2. Ileítis regional	32
4.3. Enteropatía proliferativa hemorrágica	33
CAPÍTULO II	34
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	35
OBJETIVOS GENERALES	35
OBJETIVOS ESPECIFICOS	35

CAPÍTULO III	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. POBLACIÓN DE ANIMALES Y GRANJAS	37
2. TOMA DE MUESTRAS	38
2.1. Procedimiento para la toma de muestras de sangre	38
2.2. Procedimiento para la toma de muestras de materia fecal	39
2.3. Procedimiento para la observación de lesiones macroscópicas y toma de muestras de animales sometidos a necropsia	40
2.3.1. Observación de lesiones macroscópicas	40
2.3.2. Toma de muestras de contenido de íleon y colon	41
3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	42
3.1. Procesamiento de las muestras de suero	42
3.2. Procesamiento de las muestras de materia fecal, contenido de íleon y colon y raspado de mucosa de íleon	44
3.2.1. Extracción de ADN de muestras de materia fecal, contenido de íleon y colon	44
3.2.2. Extracción de ADN de las muestras de raspado de mucosa del íleon	46
3.2.3. Amplificación del ADN	47
4. PROTOCOLOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS Y LA CARACTERIZACIÓN DE LAS DIARREAS	48
5. RECOLECCIÓN DE DATOS Y MUESTRAS	52
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	53
CAPÍTULO IV	55
RESULTADOS	56
1. PERFIL SEROLÓGICO DE <i>L. intracellularis</i>	56

2.	PERFIL DE PCR DE <i>L. intracellularis</i>	58
3.	PRESENCIA DE <i>L. intracellularis</i>	59
4.	PERCEPCIÓN E INSPECCIÓN DE DIARREAS	59
5.	CARACTERIZACIÓN DE LAS DIARREAS	64
6.	RELACIÓN ENTRE LA PERCEPCIÓN E INSPECCIÓN DE LA DIARREA CON SU CARACTERIZACIÓN	70
7.	RELACIÓN ENTRE LA PERCEPCIÓN E INSPECCIÓN DE DIARREAS Y LOS RESULTADOS DE ANIMALES NECROPSIADOS PCR POSITIVOS A <i>L. intracellularis</i>	76
8.	RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE LESIONES MACROSCÓPICAS Y LOS RESULTADOS DE ANIMALES NECROPSIADOS PCR POSITIVOS A <i>L. intracellularis</i>	77
	CAPÍTULO V	82
	DISCUSIÓN	83
1.	PERFIL Y PRESENCIA DE <i>L. intracellularis</i>	83
2.	PERCEPCIÓN E INSPECCIÓN DE DIARREAS	87
3.	CARACTERIZACIÓN DE LA DIARREA	89
4.	RELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS DE LA DIARREA, PERCEPCIÓN E INSPECCIÓN Y PRESENCIA DE <i>L. intracellularis</i>.	91
5.	RELACIÓN ENTRE LESIONES MACROSCÓPICAS Y PRESENCIA DE <i>L. intracellularis</i> POR PCR	94
	CAPÍTULO VI	97
	CONCLUSIONES	98

CAPÍTULO VIII	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
CAPÍTULO VIII	119
ANEXOS	120
Anexo 1.	120
Anexo 2.	121
Anexo 3.	122
CAPÍTULO IX	123
PUBLICACIONES	124

INDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Perfil serológico, frecuencia promedio y valores máximos y mínimos, para cada faja etaria del total de establecimientos seropositivos. **57**
- Gráfico 2.** Perfil por la técnica de PCR, frecuencia promedio y valores máximos y mínimos para cada faja etaria del total de establecimientos positivos. **58**
- Gráfico 3.** Porcentaje de granjas en que la diarrea fue percibida por el productor *versus* porcentaje de establecimientos en los que la diarrea fue inspeccionada según la edad de los cerdos (8, 15 y 21 semanas de edad). **60**
- Gráfico 4.** Porcentaje de consistencias y colores de las diarreas inspeccionadas en animales de 8 semanas de edad. **66**
- Gráfico 5.** Porcentaje de consistencias y color de las diarreas inspeccionadas en animales de 15 semanas de edad. **67**
- Gráfico 6.** Porcentaje de consistencias y color de las diarreas inspeccionadas en animales de 21 semanas de edad. **68**
- Gráfico 7.** Porcentaje de consistencias y color de las diarreas inspeccionadas en las 3 edades analizadas. **69**

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Encuesta para la colecta de datos	49
Figura 2. Ficha de campo para la caracterización de las diarreas.	51

INDICE DE FOTOS

Foto 1. Toma de muestras de materia fecal.	39
Foto 2. Proceso para la observación de lesiones macroscópicas y toma de muestras para procesar por la técnica de PCR de contenido de íleon, colon y mucosa de íleon en animales necropsiados.	41
Foto 3. Placas de ELISA procesadas para la prueba serológica.	43
Foto 4. Kit comercial QIAamp stool mini kit (Qiagen, Duesseldorf, Alemania), empleado para la extracción de ADN.	44
Foto 5. Tabla de colores inicialmente desarrollada a partir de una muestra de pinturería para la caracterización de diarreas por color.	49
Foto 6. Proceso de inspección y conteo de animales con diarrea.	52
Foto 7. Ejemplos de diarrea observadas en los animales durante la inspección realizada en los distintos establecimientos visitados.	63
Foto 8. Colores y consistencias de diarreas observadas y caracterizadas durante la inspección.	65
Foto 9. Lesiones macroscópicas de íleon observadas durante la necropsia de cerdos. A) Presencia de hiperemia, B) Mucosa de íleon con apariencia cerebroide y engrosamiento C) Superficie de la mucosa con presencia de moco y D) contenido de la luz intestinal del íleon con materia fecal de color marrón.	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de las diarreas por color	50
Tabla 2. Caracterización de las diarreas por consistencia	50
Tabla 3. Porcentaje de muestras positivas por la técnica de PCR a <i>L. intracellularis</i> en el total de muestras procesadas y relación de animales positivos por granja PCR positivas por edad.	59
Tabla 4. Concordancia entre el número de establecimientos en los cuales se observó diarrea en la inspección <i>versus</i> lo percibido por el productor a las 8 semanas de edad.	61
Tabla 5. Concordancia entre el número de establecimientos en los cuales se observó diarrea en la inspección <i>versus</i> lo percibido por el productor a las 15 semanas de edad.	61
Tabla 6. Concordancia entre el número de establecimientos en los cuales se observó diarrea en la inspección <i>versus</i> lo percibido por el productor a las 21 semanas de edad.	62
Tabla 7. Datos consolidados por edad de la población analizada, número de diarreas observadas a la inspección y porcentaje de diarreas.	62
Tabla 8. Caracterización de diarreas inspeccionadas en animales de 8, 15 y 21 semanas de edad.	64

Tabla 9. Características de color y consistencia de las diarreas *versus* la percepción del productor a la presencia de diarreas y su observación durante la inspección en los animales de 8 semanas de edad. **71**

Tabla 10. Características de color y consistencia de las diarreas *versus* la percepción del productor a la presencia de diarreas y su observación durante la inspección en los animales de 15 semanas de edad. **73**

Tabla 11. Características de color y consistencia de las diarreas *versus* la percepción del productor a la presencia de diarreas y su observación durante la inspección en los animales de 21 semanas de edad. **75**

Tabla 12. Concordancia entre la percepción de las diarreas por el productor y los hallazgos durante la inspección en granjas con resultado positivo a la técnica de PCR a *L. intracellularis* considerando la edad de los animales. **77**

Tabla 13. Concordancia entre los resultados de la técnica de PCR en contenido de íleon *versus* la presentación de lesiones macroscópicas en íleon. **78**

Tabla 14. Concordancia entre los resultados obtenidos por medio de la técnica de PCR en raspado de mucosa de íleon *versus* la presentación de lesiones macroscópicas en íleon. **78**

Tabla 15. Concordancia entre el resultado de la técnica de PCR en contenido de colon *versus* la presentación de lesiones macroscópicas en VIC. **79**

Tabla 16. Relación sensibilidad relativa – especificidad relativa – valores predictivos positivos y negativos de la relación entre los resultados obtenidos por

la técnica de PCR de las muestras de contenido de íleon, raspado de mucosa de íleon y contenido colon versus la presencia de lesiones macroscópicas en íleon y VIC. **81**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La enteritis o enteropatía proliferativa porcina (EPP) fue reportada por primera vez en la década de los 30' (Biester y Schwarte, 1931; Biester y col., 1939) pero no fue hasta comienzos de los 70's que un grupo de investigadores del Reino Unido, liderados por el Dr. G.H.K. Lawson, comenzaron estudios de campo (Rowland y Rowntree, 1972; McOrist y col., 1993; Gebhart, 2004a), que llevaron a la identificación formal de *L. intracellularis* como el agente causal de esta enfermedad (Smith y Lawson, 2001). McOrist y col., (1993) lograron la inoculación "exitosa" de animales con cultivos de una especie de bacterias curvadas halladas en cerdos afectados, reproduciendo los síntomas de la enfermedad, por lo que a partir de estos hallazgos se denominó al microorganismo "Simbionte Ileal Intracelular" y posteriormente *L. intracellularis*. En la actualidad está clasificada en la subdivisión delta de las Proteobacterias (Gebhart y col., 1993; Lawson y col., 1993) y taxonómicamente es distinta a otros patógenos intracelulares (McOrist y col., 1995; Dale y col., 1998).

L. intracellularis ha sido identificada como el único agente etiológico capaz de producir una enfermedad denominada EPP (Cooper y col. 1997; Gebhart y col., 1993), sin embargo varios nombres han sido usados para describir las manifestaciones clínicas y formas lesionales de esta enfermedad, (Lawson y Gebhart 2000; McOrist y Gebhart, 2000; Gebhart, 2004a; Hardge y col., 2005). Esta bacteria tiene aspecto de bastoncillo vibroide, curvado o recto y de extremos agudos o romos, de 1,25 – 1,75 μm de largo y 0,25 – 0,43 μm de ancho (Lawson y col., 1993; McOrist y col., 1993; Joens, Nibbelink, Glock., 1997; Gebhart, 2004a; Hardge y col., 2005).

Presenta una membrana externa trilaminar característica de las bacterias gram negativas (Lawson y col., 1993; McOrist y col., 1993; Gebhart, 2004a y Hardge y col., 2005) y no se han detectado fimbrias o esporas, pero si un único flagelo polar, largo y de motilidad pulsátil al ser observadas fuera de las células (Stills, 1991; Gebhart, 2004a

y Hardge y col., 2005). Su respiración es dependiente de la célula, por lo cual se le puede denominar “parásito energético” (McOrist y col., 2006).

Secuencias de ADN de *L. intracellularis* aislada tanto en cerdos como en otras especies de animales como hámster (Stills, 1991), caballo (Bihl, 2003), conejo (Schauer y col., 1998) fueron comparadas demostrando un grado de semejanza mayor al 98% en las secuencias correspondientes a puntos taxonómicos claves y en las proteínas de la membrana externa, lo que acreditó la posible existencia de una única “cepa” de *L. intracellularis* homogénea (Hardge y col., 2005). Adicionalmente, al comparar las características culturales y morfológicas de los aislamientos de *L. intracellularis* realizados en cerdos americanos, australianos, británicos (Knittel y col., 1996; Collins y col., 1996), y japoneses (Koyama y col., 2004), se ha encontrado que estos han sido idénticos y las lesiones intestinales que se desarrollan como resultado de la exposición experimental de estos aislamientos, han desarrollado todas las características de la enfermedad de campo, incluyendo la proliferación de la mucosa y las bacterias intracelulares, cumpliendo con los postulados de Koch's (McOrist y col., 1993; Knittel y col., 1996; Hardge y col., 2005).

La EPP ha sido descrita usando varios nombres de acuerdo con las manifestaciones clínicas y los hallazgos patológicos como: ileítis crónica, enfermedad del intestino de manguera, ileítis hemorrágica aguda, enfermedad necroproliferativa, enteritis necroproliferativa, enteritis glandular proliferativa, enteritis proliferativa, enteritis regional, ileítis terminal (Moore y col., 1996), enfermedad de la cola mojada (Gebhart, 2004a). En la actualidad 3 formas clínicas son reconocidas, aguda, crónica y sub clínica y denominadas cada una enteritis proliferativa hemorrágica porcina y EPP para las dos últimas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. MÉTODOS DE ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS DE *L. intracellularis*

1.1. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa

L. intracellularis ha afectado cerdos en todo el mundo, en establecimientos confinados o al aire libre, ya sean de alto o bajo nivel sanitario (Class y Bilkei, 2004; McOrist, 2005a; Hardge y col., 2005). En Dinamarca, Stege y col., (2000), colectaron 20 muestras de materia fecal en cada una de 79 granjas de cerdos, entre los 30-50 Kg de peso vivo sin antecedentes reconocidos de diarrea, examinadas por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), *L. intracellularis* se encontró en 74 de los establecimientos (93,7%) con una prevalencia intrapredial media del 30% (mínimo: 5% y máximo: 100%).

Biksi y col., (2006) en un estudio donde la presencia por *L. intracellularis* y *Brachyspira spp.* fue estudiada por PCR la materia fecal de cerdos de 5 a 6 meses provenientes de 31 establecimientos porcinos en Hungría, encontrando que el 93% de las granjas fueron positivas a *L. intracellularis*, de ellos en 5 (16,13%) se encontró solo este agente, infecciones mixtas de *L. intracellularis* y *B. pilosicoli* se encontraron en 11 (35,48%), *L. intracellularis* y *B. hyodysenteriae* en 7 (22,58%) y tan solo 6 (19,35%) de los predios fueron positivos a la infección por estos tres agentes.

En la república de Corea se muestrearon heces de 35 granjas, las cuales fueron procesadas por PCR, obteniendo una prevalencia del 20% (Kim y col., 1998), por otra parte en Taiwán, realizando PCR de materia fecal obtenidas de 40 establecimientos porcinos, 12 (30%) de ellos fueron positivos a *L. intracellularis* (Chang y col., 1997).

Wilson y col., (2002) realizaron una vigilancia retrospectiva de las muestras diagnosticadas como infección entérica por el laboratorio de salud animal de Alberta en Canadá durante los años 1993 a 1997, encontrando que de un total de 1168 muestras el 16.4% tuvieron como agente causal a *L. intracellularis*, convirtiéndose en la segunda causa de enfermedad entérica, estos autores demostraron además que el 15% fueron lechones entre las 3 a 10 semanas de edad, el 36% en cerdos de 10 a 18 semanas, el 14% eran cerdos de terminación de 18 a 26 semanas y el 16% en animales adultos mayores de las 26 semanas de vida. De igual forma al realizar una vigilancia similar con datos obtenidos entre 1992 y 1997 por el laboratorio de la Universidad de Guelph en Ontario, encontraron que la EPP era la enfermedad entérica infecciosa de mayor presentación con una frecuencia de 27,6 casos por año, afectando en un 84% a cerdos en etapa de crecimiento y finalización (Wilson y col., 1999).

En América latina se han realizado diferentes estudios en donde, en países como México, se encontró por PCR en materia fecal que sobre un total de 282 pjaras, el 37% de las mismas estaban afectadas por *L. intracellularis* (Socci y col., 2005); en Brasil se realizaron 2 estudios de prevalencia por PCR de materia fecal, Nascimento y col., (1999), encontraron que el 20% de 75 establecimientos seleccionados al azar fueron positivos a *L. intracellularis*, mientras que Moreno y col., (2002) de un total de 207 establecimientos encontraron que el 30% de los mismos fueron positivos a este agente. En la Argentina, durante un estudio serológico con la técnica de Inmuno Fluorescencia Indirecta (IFI) se determinó que el 76,6% de 30 explotaciones fueron positivas, encontrando una prevalencia intrapredial que varió del 57,7 al 90,1% (Perfumo y col., 2006).

McOrist y Gebhart (2000); Lawson y Gebhart (2000) concluyeron que la prevalencia de pjaras positivas a *L. intracellularis* varía entre el 60 al 90% en los diferentes países, donde la naturaleza tan extendida de la infección sugiere que esta enfermedad es endémica en la mayoría de las granjas, pero su diagnóstico a campo no

fue tan frecuente, debido presumiblemente a que muchos cerdos no presentaban una diarrea evidente (Hardge *y col.*, 2005).

Esta característica de enzootia podría estar asociada al amplio rango de especies donde se ha demostrado la presencia de *L. intracellularis* primates no humanos, conejo, rata, cobayo, potro, oveja, venado de cola blanca, hurón, zorro ártico, perros, terneros, jirafas y algunas aves, cerdos y hámsteres (Stills, 1991; Fox *y col.*, 1994; Lawson, *y col.*, 1993; Schauer *y col.*, 1998; Klein, Gebhart y Duhamel, 1999; Smith y Lawson, 2001; Lawson y Gebhart, 2000; Herbst *y col.*, 2003; Bihr, 2003; Gebhart 2004a; Dauvillier *y col.*, 2006). Esta enfermedad, no ha sido reportada en humanos (Michalski *y col.*, 2006).

Esta alta prevalencia mundial y predial puede estar justificada por los hallazgos encontrados en varios trabajos de investigación. Se ha demostrado que un cerdo infectado puede, a través de su materia fecal, ser fuente de nuevas infecciones para animales susceptibles cuando estos toman contacto con las excretas (McOrist y Lawson, 1989 y Rowlan y Lawson, 1992), también fue descrita la transmisión mecánica por medio de fómites (botas, ropas de trabajo, corrales, comedores, equipos, etc.) (Bundgaard, 2000; Collins *y col.*, 2000b; Chouet *y col.*, 2003; Jordan *y col.*, 2004) y por medio de vectores biológicos como roedores, insectos y aves, (McOrist y Gebhart, 2000; Gebhart 2004a), Viotti *y col.*, (2013) demostraron una marcación débil y fuerte para antígenos de *L. intracellularis* en enterocitos de gorriones, estos autores y otros como Bundgaard, (2000) y Chouet *y col.*, (2003) concluyeron que todos estos vectores parecen cumplir un papel importante en la conservación y diseminación del agente y que a pesar de no haber sido demostrado su papel dentro de la transmisión de la enfermedad, el potencial de los vectores biológicos dentro de la epidemiología de la enfermedad no puede ser ignorado, pudiendo asumirse que la transmisión puede darse sin que sea necesario el contacto cerdo – cerdo.

Se ha demostrado que cerdos de muy diversas edades (desde lechones recién nacidos hasta cerdos de engorde y terminación) que no hayan estado expuestos con anterioridad a *L. intracellularis* son receptivos a la infección por vía oral (Collins y col., 2000b). En cuanto a la transmisión de tipo vertical, aún no es claro si la cerda puede transmitir la infección a sus lechones, pero probablemente esto pasa en algunas ocasiones, aunque no regularmente (McOrist, 2004). Sin embargo, posibles factores como la persistencia de *L. intracellularis* en cerdos destetados junto con la excreción del microorganismo por los cerdos infectados puede ayudar a que la cerda y futura madre permanezca infectada hasta su primera preñez, por lo que su progenie podría infectarse durante la lactancia, a lo que se adicionaría el desarrollo de mecanismos de supervivencia, transmisión y mantenimiento de *L. intracellularis*, para estar presente por más tiempo en el interior de los enterocitos del huésped (Smith y McOrist., 1997).

Dentro de estos mecanismos se encuentra el tiempo en el cual *L. intracellularis* se mantiene viva en materia fecal. McOrist, (2004 y 2005a) encontró que la bacteria puede sobrevivir en las heces de los cerdos alrededor de dos semanas bajo las condiciones normales del establecimiento, mientras que Hardge y col., (2005) sugiere que *L. intracellularis* podría sobrevivir de 2 a 3 semanas en las heces, a las temperaturas que imperan habitualmente en las explotaciones porcinas, donde animales inoculados oralmente con *L. intracellularis*, mantenidas a 23°C por 14 días mostraron ser capaces de colonizar el intestino de cerdos susceptibles.

Collins y col., (2000b) detectaron que esta bacteria es capaz de sobrevivir en condiciones extracelulares y en heces por una a dos semanas entre 5-15°C de temperatura, aunque al inocular animales con dosis manejadas bajo dichas condiciones evidenciaron ausencia de signos clínicos evidentes, retraso en la seroconversión y en la eliminación fecal del agente, lo que sugiere que este tipo de condiciones pueden reducir la capacidad infectiva del agente o incluso suprimir la infección (Chouet y col., 2003). Los estudios realizados en los últimos años han permitido evidenciar que a pesar de que *L. intracellularis* es un agente muy exigente en su crecimiento y mantenimiento *in vitro*,

in vivo puede ser eliminado por largo tiempo en las heces de animales infectados, logrando resistir durante cierto tiempo las condiciones ambientales y requerir de dosis bajas para provocar la infección (Jordan *y col.*, 2004).

De acuerdo con diferentes estudios realizados para determinar el conteo de *L. intracellularis* en heces de cerdos experimentalmente infectados, se ha encontrado hasta 10^8 microorganismos por gramo de materia fecal, lo que indicaría que las heces pueden contener grandes dosis infectantes para otros cerdos (Smith y McOrist, 1997; McOrist y Gebhart, 2000; Carvajal *y col.* 2005). Existe discrepancia en cuanto a la dosis infectante necesaria para producir la enfermedad, mientras que Carvajal *y col.*, (2005) determinaron dosis infectantes de 10^7 bacterias por animal, Collins *y col.*, (2000b) tan solo 10^3 microorganismos. Sin embargo, durante otro estudio realizado por McOrist *y col.*, (1993) confirmaron que al infectar cerdos convencionales con dosis de *L. intracellularis* de $3,7 \times 10^6$ pasadas seis (6) veces en cultivo celular desarrollaron lesiones severas de EPP, y cerdos convencionales infectados con dosis menores ($1,5 \times 10^6$ y $4,0 \times 10^5$) pasadas 13 veces, desarrollaron lesiones de moderadas a leves respectivamente.

Por lo tanto, se concluiría que un número bajo de bacterias es capaz de infectar animales susceptibles (Jordan *y col.*, 2004; Guedes, 2005), la dosis infectante parece relacionarse directamente con la forma de presentación de la enfermedad y la cantidad de bacterias excretadas en una sola deposición bastan para obtener dosis infectantes suficientes para un centenar de cerdos, haciendo que la enfermedad sea de fácil diseminación y por lo tanto de alta prevalencia dentro de una granja (McOrist *y col.*, 1993; Smith y McOrist, 1997; Hardger *y col.*, 2005).

En varios estudios sobre la dinámica de esta enfermedad se ha reportado, que la eliminación de *L. intracellularis* puede comenzar en cerdos desde los 25 a 32 días de edad (Moreno *y col.*, 2002), cuando ellos poseen niveles bajos o nulos de anticuerpos (Guedes *y col.*, 2002a). Sin embargo McOrist, (2004 y 2005a) detectó la excreción de *L.*

intracellularis en animales infectados sobre las 2 semanas después de la primera infección, aunque alrededor del 10% de los cerdos pueden eliminarla durante muchas semanas. Guedes y col., (2002a), encontraron que en la mayoría de los cerdos que poseen infección intestinal y lesiones proliferativas, la excreción de las bacterias puede persistir alrededor de cuatro semanas, aunque en algunos casos puede prolongarse hasta las 10 semanas.

Por su parte, Jordan y col., (2004), observaron durante un estudio que la eliminación fecal en grupos de animales inoculados se dio entre los 8 y 16 días después del desafío, sin embargo un animal control eliminó *L. intracellularis* a partir de los 24 días y otros autores encontraron que 2 a 3 semanas después de desafiar cerdos con *L. intracellularis* entre el 65-90% de los grupos experimentales excretaron la bacteria en las heces, sin embargo el 14% de los animales inoculados no la excretaron durante el tiempo que duro el experimento (Boesen y col., 2004a; Holyoake y col., 1995).

En cuanto al periodo de incubación de esta enfermedad también se han encontrado diferencias donde McOrist y Lawson (1989), lo evidenciaron entre unos 14 y 21 días, a diferencia de Gebhart (2004a) y McOrist y col., (2006) quienes lo evidenciaron en un periodo de 7 a 14 días, con la aparición de las primeras lesiones, Jordan y col., (2004) por su parte evidenciaron seroconversión entre los 14 y 22 días pos desafío.

Durante estudios experimentales se ha encontrado que lechones infectados con *L. intracellularis* proveniente de cultivos puros u homogenizados de mucosas con lesiones de EPP, evidenciaron los primeros signos clínicos caracterizados por diarrea a los 7 a 10 días pos inoculación (Gebhart, 2004 a y b; Guedes, 2005; Boesen y col., 2004a). Seguido de un pico clínico alrededor del día 21, a lo que le prosigue la disminución de la presentación de signos clínicos y lesiones proliferativas de la enfermedad entrando en un periodo de resolución de la misma en el día 28, e incluso se han demostrado infecciones desde la primera semana hasta por encima de las 12

semanas (Smith y McOrist, 1997; Guedes *y col.*, 2002a; Guedes y Gebhart, 2003a; Guedes y Gebhart, 2003b; Guedes 2006), junto con una seroconversión alrededor de los 14 días de la exposición (Gebhart, 2004b).

Esta variabilidad en la dinámica de la enfermedad se evidencia en un estudio de Carvajal *y col.*, (2005) en un establecimiento de ciclo completo infectado con *L. intracellularis*, donde se detectó la eliminación del agente por medio de la técnica de PCR, en el 12% de las hembras gestantes, 8% de las lactantes, 35% de los animales entre las 12-17 semanas y 4% de los cerdos en terminación de 18 a 23 semanas de edad.

Por lo tanto y según Armbruster *y col.*, (2004) parece existir una relación directa en donde a mayor edad la prevalencia de *L. intracellularis* en las granjas aumenta, evidenciándose una mayor excreción fecal del agente en los animales de 15 y 18 semanas de edad. Sin embargo, la naturaleza tan extendida de la infección sugiere que esta enfermedad es endémica en la mayoría de las granjas, en las que presumiblemente muchos cerdos no presentan una diarrea evidente (Chouet *y col.*, 2003; Hardge *y col.*, 2005); por lo que parece existir una confusa relación entre la detección de la bacteria excretada en las heces, la viabilidad de la bacteria y la diarrea (Jordan *y col.*, 2004).

Las variaciones poblacionales e individuales, los factores de estrés ambiental (Jordan *y col.*, 2004), así como el efecto que ejerce el tipo de alimentación y el tipo de medicación que reciben los animales son factores capaces de influir en el tiempo en que comienza la excreción de la bacteria y la duración de la misma (Boesen *y col.*, 2004a; Collins *y col.*, 2000b).

McOrist *y col.*, (1995) afirman que la morbilidad puede estar entre el 5 y el 20%, sin embargo Burch, (2000) afirmó que esta puede estar alrededor del 30%, donde la enfermedad causa un número de signos de tipo clínico y subclínico. Sin embargo, a nivel del establecimiento esta no es la realidad completa, ya que la presencia de otras enfermedades infecciosas frecuentemente complican la situación y pueden jugar un rol

importante en el desarrollo y severidad de la enfermedad (Burch, 2000; Boesen *y col.*, 2004a).

1.2. El uso de la serología

Como puede verse por todo lo expuesto, la detección directa de *L. intracellularis* por PCR permitió demostrar que estaba presente en cerdos de casi todo el mundo, así como comprender mejor la dinámica de enfermedad y determinar tanto las prevalencias intraprediales como regionales. Sin embargo, es posible que el estudio de *L. intracellularis* por PCR subestime el número real de cerdos de una granja que han tomado contacto o han sido infectados por este agente, por lo que técnicas indirectas como la serología, pueden ser complementarias y aditivas a los hallazgos de PCR y permitir mayor consistencia en estudios de la dinámica de la enfermedad.

La serología, que involucra el estudio de la respuesta inmune del animal no resulta igual para cualquier agente. Al ser un patógeno intestinal, *L. intracellularis* parece no inducir una infección sistémica, por ello la respuesta humoral es poco intensa y lenta en su desarrollo (Guedes *y col.*, 2002b). McOrist *y col.*, (1993), afirman que durante el proceso de seroconversión no se ha observado infiltración de la mucosa por células inflamatorias en los cerdos afectados experimentalmente, lo que confirma la característica de la contestación inmune débil de la enfermedad natural. Guedes *y col.*, (2002b), observaron que la débil respuesta humoral puede estar presente a las 4 semanas después de la exposición oral a *L. intracellularis*, lo que se interpretaría como una exposición al agente pero no necesariamente indicaría infección.

La infección de la mucosa está relacionada con la respuesta local durante la cual son producidos altos niveles de IgA; las células epiteliales afectadas contienen una gran acumulación de dicha Ig a nivel intracelular, permitiendo su identificación en alto grado, en lavados intestinales entre los 15 y 29 días pos desafío (Hardge *y col.*, 2005; Guedes y Gebhart, 2004). Es probable que las IgA secretoras jueguen un papel

importante en el bloqueo de la adhesión del patógeno a sus receptores específicos en la membrana de los enterocitos y por lo tanto en la invasión subsecuente o en la reducción de futuras infecciones (Hardge *y col.*, 2005; Guedes *y col.*, 2002a).

Al igual que en la mayoría de las infecciones bacterianas, la respuesta antigénica mediada por linfocitos B en cerdos infectados por *L. intracellularis* muestra una respuesta sistémica inicial con producción de IgM, seguida por un nivel máximo de IgG con una posterior disminución durante las siguientes semanas (Hardge *y col.*, 2005), Knittel *y col.*, (1998) observaron que la respuesta predominante de IgM persistió cerca de 8 semanas.

Al medir la respuesta de IgG posterior a la infección con *L. intracellularis*, la primera respuesta puede ser detectada a los 14 días de la infección, pero es solo después de los 21 días donde la respuesta se generaliza detectándose en la mayoría de los animales expuestos a la bacteria (Collins *y col.*, 2000a; Hardge *y col.*, 2005), Armbruster *y col.*, (2004), de igual manera encontraron altas seroprevalencias entre animales de 21 y 24 semanas de edad.

Se ha encontrado que en granjas donde la infección es endémica, los lechones hasta las 3 semanas presentaban una curva declinante de anticuerpos, para comenzar la seroconversión entre las 7 y 24 semanas de edad (Holyoake *y col.*, 1994). De manera similar diferentes autores han detectado que los anticuerpos de IgA e IgG contra *L. intracellularis* se transmiten a sus lechones de forma rutinaria en el calostro de cerdas seropositivas, los que pueden durar en estos hasta las cuatro semanas de edad (Guedes *y col.*, 2002b; Hardge *y col.*, 2005; Holyoake *y col.*, 1994; Wendt *y col.*, 2000). Sin embargo, Hardge *y col.*, (2005), encontraron que en establecimientos con infección endémica, los lechones recién nacidos presentan títulos altos de IgG en el suero, los cuales decrecían alrededor de las 6 a 8 semanas de edad. Estos resultados sugieren que la IgG juega un papel determinativo al definir la susceptibilidad de los cerdos ante la infección natural.

En los casos hemorrágicos más agudos de enteropatía proliferativa, el pico de IgG es mucho mayor y su subsiguiente disminución es mucho más lenta que en la forma crónica. Por lo que Guedes *y col.*, (2002a), sugieren que la detección de la IgG en suero podría interpretarse como un indicador de exposición a la bacteria y la presencia de lesiones a nivel intestinal. Por el hecho de que *L. intracellularis* es una bacteria intracelular obligada que reside en el citoplasma de enterocito, no se cree que los niveles de IgG estén involucrados directamente en la protección (Guedes *y col.*, 2002a y b).

Al estudiar la duración de la respuesta inmune que se genera posterior al desafío de los cerdos con *L. intracellularis*, Mauch y Bielkei, (2005a), encontraron que en establecimientos positivos los anticuerpos contra *L. intracellularis* aparecían desde la quinta hacia las 26 semanas de edad, con un pico de seroprevalencia a las 11 semanas de vida. En granjas con historia de ileítis, Keller *y col.*, (2004 a y b) encontraron una alta reactividad en madres y cerdas de reemplazo donde los anticuerpos aumentaron entre las 13 y 24 semanas y dentro de la población encontraron una clara seroconversión entre los cerdos de 7 y 13 semanas de vida. Knittel *y col.*, (1998) registraron una duración máxima de 6 semanas pos inoculación experimental en cerdos con cultivos puros de *L. intracellularis*. Sin embargo, durante un estudio realizado por Guedes *y col.*, (2002a), quien siguió un brote de enteropatía proliferativa hemorrágica en primerizas, estas desarrollaron altos títulos de anticuerpos en suero los cuales duraron por encima de 3 meses en algunos animales.

Por lo tanto, es posible que cerdas con un mayor número de partos demuestren un efecto protector sobre la transmisión vertical de *L. intracellularis*, la cual pueda deberse al incremento de la inmunidad pasiva o menor eliminación del agente en cerdas adultas (Mauch y Bielkei, 2005 a y b).

En cerdos en etapa de desarrollo y terminación los títulos se han mostrado bajos, con una duración normal de 3 semanas, donde el porcentaje más alto de positivos se

encontró en cerdos entre las 19 y 22 semanas de edad según Guedes *y col.*, (2002a y b), mientras que Just *y col.*, (2001), lo describieron alrededor de las 12 y 16 semanas de vida. Existen animales que se han infectado de manera natural y no son capaces de establecer una respuesta inmune antes de las 24 semanas de edad lo que podría explicar la presentación de episodios continuos de enteropatía proliferativa hemorrágica en cerdos de finalización (Armbruster *y col.*, 2004; Holyoake *y col.*, 1994).

Estas diferencias en las respuestas inmunes podrían relacionarse con factores como los diferentes programas antimicrobiales, flujo animal, tipos de instalaciones principalmente los pisos (Guedes *y col.*, 2002a) o con la forma clínica y la severidad con que se esté presentando la enfermedad en el establecimiento (Gebhart, 2006; McOrist *y col.*, 1995), así como una relación directa entre la respuesta inmune y la dosis infectante (Holyoake *y col.*, 1994).

En cuanto a la eliminación de *L. intracellularis* en las heces y su relación con la respuesta inmune Guedes *y col.*, (2002a y b) señalaron que esta se dio principalmente a las 13 y 16 semanas de edad y la seroconversión a las 19 y 22 semanas, indicando el intervalo existente entre la eliminación y la presencia de anticuerpos, calculándola entre 3 a 6 semanas. Lo cual hace pensar que la eliminación de *L. intracellularis* en heces es el primer hallazgo en animales infectados en condiciones de campo, y que el nivel de infección en algunos de estos animales probablemente no promueva una respuesta inmune del sistema humoral suficientemente alta, para ser detectada por serología, por lo que la misma podría desestimar la infección (Guedes *y col.*, 2002a).

Boesen *y col.*, (2004b), concluyeron que los niveles de anticuerpos fueron máximos durante el tiempo de excreción fecal de la bacteria y disminuyó una vez finalizó la eliminación, sin embargo la seropositividad se mantuvo durante 20 semanas pos destete. Lo que concuerda con lo encontrado por Jordan *y col.*, (2004) quienes al comparar datos serológicos con la excreción de *L. intracellularis* encontraron que la seroconversión puede ocurrir sin que pueda ser detectada por PCR la bacteria en las

heces, sugiriendo que los bajos niveles del agente pueden causar la seroconversión en el animal, sin detectar la eliminación de la bacteria o que se observen signos clínicos en los animales. Sin embargo, Guedes *y col.*, (2002b) afirman que la asociación entre los títulos serológicos, la presentación de lesiones macroscópicas y la excreción de la bacteria es casi inexistente.

De acuerdo a los antecedentes revisados hasta aquí, se puede inferir que la detección directa de *L. intracellularis* por PCR e indirecta por serología de ELISA son las mejores técnicas a usar cuando se quiere determinar la prevalencia regional e intrapredial y la dinámica dentro de poblaciones porcinas de esta bacteria.

2. TÉCNICAS DE ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de la ADN por medio de la técnica de PCR es una prueba muy sensitiva empleada para el diagnóstico de enfermedades causadas por agentes exigentes y de difícil manipulación en el laboratorio (Jones *y col.*, 1993b), inicialmente la PCR y las pruebas de ADN fueron usadas para el seguimiento del curso de la infección en sus fases tempranas (Jones *y col.*, 1993a, b, c).

Sin embargo, el desarrollo extenso de estudios genómicos hicieron posible la construcción de segmentos de ADN específicos que permitieron caracterizar la *L. intracellularis* (Stills, 1991; McCluskey *y col.*, 2002) que junto con el desarrollo de la prueba de PCR han permitido su realización en tejidos y materia fecal, facilitando el diseño de estudios que han permitido supervisar el curso de la infección después de desafiar los animales con cultivos puros, dando a conocer información como la duración de infección en cerdos, la cantidad de *L. intracellularis* en las heces, identificar

animales portadores o las correlaciones existentes entre dosis y efecto clínico (Jones y col., 1993b; McOrist y col., 1994; Smith y McOrist, 1997).

Se han desarrollado distintos tipos de PCR, como PCR simple, nested PCR y PCR mixtos o múltiples (Jones y col., 1993 a y b). Para los cuales se han empleados segmentos divididos en 3 sets, los cuales han sido usados para el diagnóstico molecular del agente, Set 1 y Set 2 (Gebhart y col., 1993 y 2004b; Jones y col., 1993b y c), estos dos sets pueden ser usados en el PCR simple o N-PCR. El Set 3 es empleado para el PCR Multiplex: (Gebhart y col., 1993 y 2004b; Jones y col., 1993a; La y col., 2004).

Diferentes técnicas de PCR han sido desarrolladas para la detección de *L. intracellularis* en heces (McOrist y Gebhart, 2000; Gebhart 2004b). La sensibilidad de esta prueba puede variar (entre el 39 a 72%), pero su especificidad es muy consistente (alrededor de un 97% al 100%) (Gebhart, 2004a). La sensibilidad se puede ver afectada debido a las cualidades de la materia fecal y a la presencia de factores inhibitorios de la PCR, lo que hace que la prueba sea efectiva para comprobar la presencia del microorganismo en las heces de cerdos que padecen la enfermedad en forma clínica pero de acuerdo con Gebhart y Guedes, (2001) y Gebhart, (2004b), no es suficientemente sensible en aquellos animales que presentan cuadros subclínicos.

Jacobson, (2003) indica que la sensibilidad de esta técnica puede ser buena si se realiza una buena purificación del ADN, ya que esta decrece debido a la presencia de factores de inhibición de este tipo de muestras. El proceso de amplificación puede verse inhibido por la interferencia con el paso de lisis celular junto a la plantilla de nucleótidos, o por la interacción con enzimas. Sin embargo, la inhibición puede variar entre los diferentes tipos de muestras y probablemente también entre las diferentes especies animales.

De acuerdo con Smith y McOrist, (1997), durante un estudio se encontró una posible relación entre el tamaño de la dosis infectante y la cantidad de *L. intracellularis*

excretada, lo que puede afectar el resultado de la prueba diagnóstica de PCR ya que animales inoculados con bajas cantidades del microorganismo resultaron negativos a la prueba.

Por otra parte, la eliminación fecal de *L. intracellularis* según Jordan y col., (2004) es detectada por la técnica de PCR de manera intermitente, por lo que la detección por PCR puede estar precedida por la manifestación clínica diarreica, sin embargo es confusa la relación que pueda existir entre la detección de la bacteria excretada en las heces, la viabilidad de la bacteria y la diarrea.

Jones y col., (1993b), realizaron la prueba de PCR en heces de cerdos para detectar *L. intracellularis*, durante este ensayo realizaron la amplificación del ADN logrando un producto final de 319-bp, la cual fue sometida a un reamplificación con los primers internos C y D para confirmar si esta amplificación era derivada de *L. intracellularis*, aumentando la sensibilidad de la prueba; este producto de 319-bp logro ser detectado en muestras con concentraciones de 10^4 hasta 10^1 organismos. Aunque estos autores, afirman que la forma más sensitiva para detectar *L. intracellularis* puede ser lograda por la amplificación y reamplificación interna de los primers, esta reamplificación resulta no ser necesaria para la detección de *L. intracellularis* en cerdos infectados.

Otro de los parámetros que pueden afectar los resultados de la técnica es el tiempo de almacenamiento de la muestra, la cual de acuerdo con Jones y col., (1993b) la amplificación apropiada de fragmentos de ADN fue detectada en muestras almacenadas a -80°C por 1 a 6 meses, pero no lo fue en muestras almacenadas por 10 meses.

Knittel y col., (1998) lograron amplificar la bacteria 3 semanas pos infección en el 39% de los cerdos desafiados, Guedes y col., (2002a) lo consiguieron al día 14 y 21 pos desafío, Collins y col., (2000 a y b) 14 y 23 días pos inoculación, es por esto que Holyoake y col., (1995) sugieren que para incrementar la sensibilidad de la técnica se

realicen pools de muestras fecales que pueden ser empleadas para la identificación de grupos de cerdos afectados con EPP. Sin embargo, estos investigadores aclaran que la sensibilidad depende de la prevalencia de la enfermedad dentro del grupo de cerdos muestreados y el número de muestras colectadas.

Otra de las técnicas de PCR desarrolladas es la Multiplex la cual se desarrolló con el objeto de detectar diferentes agentes en las heces de manera simultánea logrando la reducción del tiempo y del trabajo laboratorial (Baccaro *y col.*, 2003; Suh y Song, 2005). Para el caso de *L. intracellularis* se ha empleado la técnica para su diagnóstico exclusivo, así como para el diagnóstico de esta bacteria junto con otras como *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella* (La *y col.*, 2003 y 2004; Baccaro *y col.*, 2003). El PCR Multiplex específico para *L. intracellularis* es una técnica que involucra el uso de dos sets o primers de *L. intracellularis* diferentes con lo que se busca incrementar la especificidad de la técnica en muestras de materia fecal (Gebhart, 1996; Cooper, Swanson y Gebhart, 1997).

Pese al desgaste de tiempo, alto riesgo de contaminación, la necesidad del uso de un kit comercial y los altos costos, Jacobson *y col.*, (2004) afirman que el mejor método para la diagnóstico de la EPP aguda es la técnica de PCR en muestras fecales o de tejido.

Jacobson *y col.*, (2004) encontraron que la detección de *L. intracellularis* en muestras de tejido demostró una buena especificidad y correlación con las lesiones macroscópicas, logrando una sensibilidad de 10^1 - 10^2 moléculas mímicas por tubo lo que coincide con Gebhart, (1996) quien también logro detectar una concentración de 10^1 organismos. Sin embargo Jacobson *y col.*, (2004) en muestras fecales procesada por PCR con lisis celular por medio de la técnica de hervido logro una mayor sensibilidad de 10^2 - 10^3 moléculas mímicas por el tubo de reacción.

2.2. Técnicas serológicas

Se han reportado diferentes métodos ELISA para detectar la IgG humoral. Estos ELISAs tienen la ventaja de testar varias muestras simultáneamente, generando un reporte de resultados automático y disminuyendo la posibilidad de sesgos en la evaluación de las muestras. Esto incluye un LPS-ELISA indirecto, una unión entre la ELISA y el Lipopolisacárido (LPS) con el antígeno (Kroll *y col.*, 2005), la ELISA de bloqueo y la ELISA completa con sonicado de células (Gebhart, 2004a).

Kroll *y col.*, (2005) encontraron que el LPS ELISA contó con una sensibilidad y especificidad del 88.75% y 93.7% respectivamente, durante una prueba con 80 sueros reconocidos como positivos y 80 reconocidos como negativos; sin embargo, comprobaron que durante un experimento durante el cual se desafiaron cerdos con *L. intracellularis* obtuvieron una sensibilidad de 99,5% y una especificidad del 100%. La técnica LPS ELISA es capaz de descubrir mayor cantidad de animales positivos en los días 21, 28, 35 y 42 después de un desafío. Lo que implicaría, la posibilidad de descubrir el tiempo de exposición de los animales mucho antes, permitiendo la implementación de una estrategia de control precisa y rápida.

La ELISA de bloqueo actúa como indicador de la exposición a *L. intracellularis* y ha mostrado ser sensible y específica como otros test previos (Gebhart, 2004a). Los resultados de la serología son similares usando cualquiera de los test y mostrando igual sensibilidad y especificidad en trabajos donde se han evaluado animales experimentalmente infectados (Gebhart, 2004b), Keller *y col.*, (2004 a y b), encontraron que esta técnica detecta animales positivos de 10 a 16 semanas de edad.

Recientemente se emplea la técnica de ELISPOT la cual se usa para la detección de células mediadoras específicas de la respuesta inmune (producción de gamma-interferon IFN- γ) de linfocitos T para antígeno de *L. intracellularis* (Gebhart y Guedes, 2001; Gebhart, 2004b). Guedes y Gebhart, (2003a) indican que en esta técnica la

producción del IFN- γ por activación de los linfocitos T puede depender de la concentración de antígeno de *L. intracellularis* empleado en el test de ELISPOT, por lo que concluyen que este IFN- γ juega un papel significativo limitando la infección y la proliferación celular causada por *L. intracellularis*.

Por lo tanto, las técnicas serológicas han demostrado ser útiles como rutina diagnóstica de la enfermedad y determinar la presencia de ileítis en cerdos de todo el mundo (rangos entre 60% a 90% en diferentes países), (Gebhart, 2004a), sin embargo la respuesta inmune humoral de cerdos infectados con *L. intracellularis* es frecuentemente débil y de corta vida. Además la serología proporciona solo información de tipo histórica sobre la exposición del animal al agente lo que complicaría el diagnóstico de la adenomatosis intestinal porcina (AIP) ya que la infección puede incubarse muchas semanas antes de que comience la respuesta seropositiva (Gebhart, 2004 a y 2004b). Por esto es usada en estudios de corte transversal y estudios de perfil serial de la respuesta humoral para la implementación de medidas de control y la prevención en establecimientos donde la ileítis sea endémica.

Corzo *y col.*, (2005a y b) sostienen que las técnicas serológicas son una buena herramienta para la clasificación de las piaras haciendo posible conocer si una población ha estado expuesta o no a la enfermedad; sin embargo, no permite identificar a los animales portadores, debido a que las concentraciones de anticuerpos en suero son muy bajas durante la exposición inicial y el comienzo de la infección (Guedes *y col.*, 2002b) a lo que se suma la necesidad de contar con personal hábil y experimentado que realice con precisión la interpretación de estas técnicas (Kroll *y col.*, 2005), por lo que la técnica de PCR se convierte en una buena herramienta para detectar a *L. intracellularis* antes de que la respuesta inmune pueda ser detectada (Corzo *y col.*, 2005a y b).

Se cree que la respuesta serológica sistémica no es un buen indicador de la inmunidad o de la eficacia de la vacunación, sin embargo, mediante la realización de seroperfiles a lo largo del ciclo de producción, podría ser un buen indicador del

momento en que se produce la exposición a la bacteria (Jordan *y col.*, 2004; Hardge *y col.*, 2005).

3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

3.1. Características de las diarreas

Cualquier alteración en el normal funcionamiento de los procesos bioquímicos y fisiológicos del animal conllevan a un impacto negativo sobre los parámetros productivos y económicos de su crianza. Por lo tanto y para objeto de este trabajo, se diría que cualquier alteración por patógenos y otros factores en el normal funcionamiento del intestino delgado, lugar en donde son digeridos y asimilados los nutrientes por medio de la acción de enzimas pancreáticas, ácidos biliares y los enterocitos, desencadenaría la presentación de heces con mayor contenido de agua y de diferentes colores, lo que se denomina diarrea (Sorden, 2001; Rincón *y col.*, 2002; Burch, 2004), que es una manifestación clínica de uno de los más comunes complejos de enfermedades del cerdo en todo el mundo (Jacobson, 2003), esta aparece ocasionalmente en un animal pero es más frecuente que ocurra como un problema repetitivo dentro de una granja involucrando muchos animales (Jestin *y col.*, 1985; Nabuurs *y col.*, 1993; Johnstos *y col.*, 2001).

Investigando las posibles causas de diarrea más comunes Thompson, Smith y Murray, (1998), encontraron que en 85 establecimientos de la Unión Europea entre 1992 y 1996, *L. intracellularis* fue el único agente causal de esta manifestación en tres (3) de los establecimientos y en coinfección con *B. pilosicoli* en seis (6) establecimientos. Donde la cronicidad de los cambios patológicos hallados en este estudio, indicarían que la infección por *L. intracellularis* podría preceder a la de *B. pilosicoli* u otros agentes; lo que implicaría que *L. intracellularis* podría predisponer a la mucosa del intestino a la infección con otros agentes. De igual manera Löfstedt y

col., (2004) durante un estudio en Suecia también encontraron que *L. intracellularis* y *B. pilosicoli* fueron aisladas en el 48% y 33% de las granjas, respectivamente, donde la infección mixta con estos dos patógenos se estableció en el 10% de las explotaciones estudiadas.

Nuevamente Thompson, (2006), durante un estudio realizado sobre 98 establecimientos de la Unión Europea, encontró que *B. pilosicoli* continuaba siendo la causa de diarrea más prevalente, junto con *B. hyodysenteriae*, *L. intracellularis*, *Salmonella spp* y *Yersinia spp.*, donde *L. intracellularis* fue hallada como el agente primario de infección en el 10% de las explotaciones, en infección mixta en el 15% de las granjas y con una incidencia global del 25%.

Por lo tanto Jacobson *y col.*, (2003) y Löfstedt *y col.*, (2004), concluyeron que los dos patógenos que están normalmente envueltos en la presentación de los procesos entéricos en cerdos en etapas de finalización son la *B. pilosicoli* y la *L. intracellularis* principalmente. Sin embargo, es de resaltar que cuando se usan técnicas diagnósticas de mayor sensibilidad, parecería que *L. intracellularis* es el agente más prevalente.

3.2. Diarreas producidas por *L. intracellularis*.

Usualmente existe mayor conciencia de que la forma aguda de la enfermedad cuando se presenta en una granja produce altas pérdidas económicas, debido a sus manifestaciones clínicas típicas y pérdidas de animales por mortalidad (Guedes *y col.*, 2000 a y b; Guedes, 2006). Sin embargo, las formas de presentación subclínica o crónica de la enfermedad han demostrado a nivel mundial una alta prevalencia intrapredial (Guedes *y col.*, 2000 b; Guedes, 2006), como lo indican Moller *y col.*, (1998), quienes encontraron que la forma crónica de la enfermedad es la que comúnmente se presenta en las granjas de Europa las cuales cuentan con estatus sanitarios altos y estándar, en donde la reducción de la ganancia de peso, el incremento de la conversión alimenticia y el bajo rendimiento, son reconocidas como las

manifestaciones que podrían ocasionar las más importantes pérdidas económicas (McOrist, 2005b, Johnstos *y col.*, 2001). Lo que se evidencia al estimar las pérdidas económicas derivadas de la sintomatología típica de la EPP, que incluye diarrea, pérdida de peso y melena, en donde se calcula que estas producen a la industria porcina pérdidas económicas de alrededor de U\$100 millones (cien millones de dólares) por año (McOrist y Gebhar., 2000).

Se ha evidenciado que el impacto de la enfermedad sobre el desempeño de los animales de engorde hace que estos alcancen los 25Kg de peso a los $85,6 \pm 3,6$ días, a comparación de los cerdos no infectados quienes normalmente alcanzan el peso entre los $64,7 \pm 2,6$ días, (Jacobson *y col.*, 2003 y Guedes, 2004 y 2006), lo cual suele empeorar al presentarse una infección concomitante con otros agentes (Jacobson *y col.*, 2003). Estas pérdidas económicas pueden evidenciarse a partir de las 3 semanas después de la infección en donde los cerdos disminuyen en forma significativa su peso, sin embargo, es posible encontrar animales que reducen de peso de forma moderada, dificultando la detección del problema y por lo tanto su diagnóstico (Smith y McOrist., 1997).

Otro de los impactos económicos que la EPP puede causar se da por el efecto que *L. intracellularis* causa en las madres las cuales a consecuencia de la pérdida de su condición corporal y de su salud pueden presentar abortos, lo que empeora ya que una vez ocurre el brote y este es tratado, las cerdas pueden presentar un menor desarrollo reproductivo el cual se refleja en la disminución de la tasa de concepción, la tasa de partos, número de nacidos vivos y tamaño de la camada (Mauch y Bilkei., 2005b). Las formas o manifestaciones clínicas de la EPP están clasificadas en 3, la forma crónica, aguda y subclínica las cuales se describen a continuación:

3.2.1. Forma crónica

Posee diferentes nombres como adenomatosis intestinal porcina (AIP), hiperplasia intestinal adenomatosa o EPP, (Rowland y Rowntreer, 1972; Lawson y

Gebhart, 2000; Gebhart, 2004a). Dicha forma clínica, se da en cerdos en etapa de crecimiento de 6 a 16 semanas de edad (20-50Kg) de acuerdo con Burch, (2000), pero Gebhart, (2004a) y Stevenson, (2001) afirman que esta forma es común en cerdos de 8 a 24 semanas de edad, por otra parte Hardge *y col.*, (2005), indican que estas edades puede variar en cada granja en función de la epidemiología de la misma.

En la mayoría de estos establecimientos las formas crónica y subclínica ocurren luego de que los niveles de anticuerpos maternos declinan después del destete, cuando los lechones son más susceptibles a la infección, lo que sucede alrededor de las 4 a 5 semanas de edad y suele coincidir con el momento del destete, la mezcla de animales o con el inicio temprano de la etapa de crecimiento (McOrist 2004 y 2005a) o cualquiera de los factores de riesgo mencionados anteriormente.

Cursa con un número de signos clínicos y subclínicos como diarreas moderadas, depresión, desigualdad de la tasa de crecimiento y baja eficiencia de conversión del alimento que puede darse en cerdos de 6 a 20 semanas de edad (McOrist, 2005a y b) y por lo tanto el retraso al sacrificio de los animales debido a que estos suelen presentar distintos grados de anorexia en donde los cerdos se acercan a las tolvas pero no comen o tienen un consumo de pienso bastante menor de lo habitual (Stevenson, 2001; Gebhart, 2004a; Hardge *y col.*, 2005).

En el caso de presentarse signos clínicos muy manifiestos, el deterioro de la ganancia media diaria es más elevado llegando a disminuir entre el 5% y el 20%, si bien en infecciones experimentales se han medido disminuciones de ganancia media diaria de hasta el 33%, de igual forma, el índice de conversión aumenta notablemente entre el 5% y el 20% la cual durante infecciones experimentales ha llegado al 31% (Hardge *y col.*, 2005).

Wilson *y col.*, (1999), encontraron que la manifestación diarreica fue reconocida en el 11% de los casos y 29% de las explotaciones y la diarrea con sangre en el 16% de

los casos y 31% de las granjas, demostrando así que la diarrea es una de las manifestaciones más importantes la cual es descrita de diferente forma por diferentes autores (Rowland y Lawson, 1992; Lawson y Gebhart, 2000), Guedes *y col.*, (2002a) manifiestan que además de la apatía, las heces contienen restos de pienso sin digerir y van siendo cada vez menos consistentes hasta hacerse en la mayor parte de los casos muy pastosas, con aspecto de cemento blando y en algunos cerdos con consistencia líquida. Por su parte Burch, (2000), sostiene que estas diarreas son de coloración grisácea, sin embargo la presencia de otras enfermedades infecciosas frecuentemente complican la situación y pueden jugar un rol importante en el desarrollo y severidad de la “diarrea grisácea” comúnmente encontrada en cerdos en crecimiento. Boesen *y col.* (2004a), observaron durante un estudio que la manifestación diarreica fue muy limitada, incluso en cerdos que excretaron la bacteria por largos periodos, pero pudo evidenciar diarreas en cerdos inoculados con *L. intracellularis* que presentaron un brote de *E. coli*, respaldando lo afirmado anteriormente.

Por otra parte McOrist, (2005a) afirma que la presencia de diarrea puede ser generalmente moderada y de consistencia blanda o pastosa, pero conservando la normalidad en el color. En el mismo trabajo el autor indica que en muchos casos, la materia fecal puede tener una textura similar al barro y con poca forma, similar a las heces vacunas con aspecto de cemento húmedo (McOrist, 2005 a y d).

En casos severos las heces pueden contener mayor cantidad de agua presentándose una diarrea acuosa con textura lodosa, debido a la presencia de alimento no digerido de color gris-verde, y sin moco (McOrist 2005b). Gebhart, (2004a) y Stevenson, (2001) reportaron la presentación de diarreas con una coloración amarilla verdosa, aunque algunos animales pueden no presentarla, finalmente luego de 1 a 2 semanas, la mayoría de los cerdos se recuperan pero algunos continúan desmejorando.

Guedes *y col.*, (2002a), encontraron que algunos animales desarrollaron la manifestación diarreica en la primera semana pos-desafío pero solo después de la

segunda semana los signos clínicos se hacen más evidentes, mostrando un pico de presentación a la tercera semana y recuperándose hacia los 28 días pos inoculación, haciendo claridad en que la sintomatología de esta forma clínica muchas veces puede pasar desapercibida (Guedes, 2005).

Durante un ensayo realizado por Guedes, (2006) la forma crónica de la enfermedad se caracterizó por un cuadro diarreico que comenzó alrededor de los 7 a 12 días pos inoculación, el pico de la enfermedad se dio en la tercera semana y luego los animales tendieron a recuperarse de la enfermedad, mientras que casi el 30% de infectados no desarrollaron ningún signo de diarrea (Gebhat, 2004b). Sin embargo, el rendimiento del crecimiento de los animales inoculados al compararlo con los no inoculados, siempre fue mejor en los no inoculados. Smith y McOrist, (1997) encontraron que en cerdos inoculados oralmente la diarrea empezó a las 2 semanas pos desafío y esta persistió por 1 a 2 semanas.

3.2.2. Forma subclínica

A esta forma también se le denomina enteropatía proliferativa subclínica y es la más común en las granjas en especial aquellas que se han infectado desde mucho tiempo atrás, en las que permanece como enfermedad enzoótica (Hardge *y col.*, 2005).

La enfermedad puede presentar la ausencia de los signos clínicos (Knittel *y col.*, 1998) o estos se pueden hacer poco manifiestos y solo ser detectables en aquellas granjas donde llevan un control estricto de parámetros como índice de conversión y ganancia media diaria, sin embargo en todos los casos la lesión del tejido entérico se inicia microscópicamente y evoluciona hasta evidenciarse a nivel macroscópico (Smith y McOrist, 1997; Lawson y Gebhart 2000; McOrist y Gebhart, 2000; Gebhart, 2004a; Hardge *y col.*, 2005). En los casos más leves de EPP (subclínica), los signos clínicos que suelen presentarse son: la disminución de la ganancia media diaria de peso y el aumento del índice de conversión, esto ocasiona que los cerdos realmente afectados

sean difíciles de reconocer, de igual forma, a la necropsia estos animales presentan lesiones leves en el intestino delgado (Guedes *y col.*, 2003).

Factores como el grado de afección de los cerdos enfermos, las diferencias en el momento del inicio de la infección y un mayor grado de resistencia individual frente a la enfermedad, hacen que las manifestaciones clínicas sean mucho más evidentes, ocasionando desigualdad en lotes afectados así como su retraso al sacrificio, ya que el porcentaje de cerdos con bajo peso deberán mantenerse más tiempo en el sistema de producción y/o venderse como saldos, haciendo que el productor enfrente un descuento en el precio de venta y por lo tanto pérdidas económicas (Holyoake *y col.*, 1995; Hardge *y col.*, 2005 y McOrist 2005a y b.). Al respecto McOrist, (2005a y 2005b) indica que estas granjas deben ser examinadas cuidadosamente para evidenciar que en realidad se esté dando un buen crecimiento de la población, e identificar los casos irregulares de diarrea y cerdos raquíticos. Por lo tanto, es necesario revisar los datos productivos para la detección de los cambios en la ganancia media de peso y en la eficacia de la conversión en los animales pos destetos.

3.2.3. Forma aguda

Es la de mayor incidencia en animales de reemplazo o en edad de terminación y sacrificio, de acuerdo con (Burch, 2000), se observa en animales de 60Kg en adelante y casi siempre en cerdos entre 4 a 12 meses de edad de acuerdo con Gebhart (2004a), Guedes (2005), Stevenson, (2001); aunque McOrist (2004) indica que puede verse en cerdos con 3 a 12 meses de edad.

Cursa con diarrea hemorrágica y muerte súbita, por lo que se le denomina enteropatía proliferativa hemorrágica (Lawson y Gebhart 2000; Gebhart, 2004a). Dicha forma se observa en las granjas con menor frecuencia que las formas crónica y subclínica, y cuenta con un cuadro más severo y fatal (Lawson y Gebhart, 2000; Hardge *y col.*, 2005).

En granjas de un solo sitio, se ha establecido que el porcentaje de cerdos portadores seropositivos a EPP pertenecientes al núcleo reproductivo, está por encima del 30%. En comparación con algunos establecimientos modernos, los denominados de alta sanidad y/o multi-sitios, donde la pira reproductiva es limpia y se encuentra separada de los animales en distintas etapas de desarrollo, se ha observado que este alto nivel sanitario puede ser un factor negativo para la presentación de la EPP, debido a que la exposición de la descendencia a *L. intracellularis* es tardía, dándose durante la etapa de finalización, donde la mayor exposición se da desde los 4 o 5 meses de edad, con lo cual los animales son más susceptibles a la presentación de la enfermedad en forma aguda, principalmente porque no existen anticuerpos pasivos (McOrist, 2004).

McOrist, (2004) afirma que aún no está completamente claro de donde proviene la infección tardía de animales en terminación, pero es probable que restos de heces infectadas en alguna parte del mismo establecimiento, como en pozos estercoleros, agua reciclada de desagües y botas, ropas, corrales o jaulas y senderos puedan ser los responsables, lo que explicaría la naturaleza consistente de la infección tardía, puesto que si roedores u otros vectores estuvieran involucrados, entonces la infección sería rara y más esporádica.

La mortalidad es mucho más elevada que en la forma crónica, ya que en condiciones normales no supera el 50%, pero puede alcanzar hasta un 70% de los cerdos del lote afectado aunque normalmente se mantiene entre el 15% y el 50% (Hardge y col., 2005).

En lotes afectados por la enfermedad los signos clínicos duran unos días, posteriormente se ha encontrado que los cerdos sobrevivientes se recuperan en un tiempo de 7 a 10 días (Hardge y col., 2005). McOrist, (2004) ha encontrado que la aparición de varios casos de ileítis aguda en forma simultánea puede darse después de que ocurren algunos eventos específicos, tales como: el movimiento de los cerdos a nuevas instalaciones, la introducción de un grupo nuevo de animales a la cadena

productiva, realizar la cuarentena de porcinos entrantes en corrales que fueron anteriormente destinados a la crianza, prácticas de transporte en camiones y otras medidas de manejo que podrían favorecer la presentación de esta forma clínica.

El cuadro clínico de esta enfermedad puede darse de forma hiperaguda en donde algunos cerdos presentan muerte súbita debido a la hemorragia masiva del íleon, acompañada por palidez del cadáver y la presencia de heces oscuras con aspecto parecido al alquitrán (Stevenson, 2001; Gebhart, 2004a y b; McOrist, 2004, 2005c; Hardge *y col.*, 2005). Sin embargo, normalmente se observa un cuadro agudo, en el que la primera manifestación es la eliminación de heces diarreicas de color café oscuras a negras, sanguinolentas o con aspecto de alquitrán (Stevenson, 2001; Gebhart, 2004a y b; Busse, 2004), debido a que la sangre contenida en el intestino logra ser medianamente digerida (Gebhart, 2004a y b; Stevenson, 2001; McOrist, 2005c y d).

No está claro por qué la EPP aparece en unas ocasiones en forma aguda y la mayor parte de las veces lo hace de la forma crónica. McOrist, (2004) afirma que los casos son usualmente vistos en naves de cerdos adultos que se encuentran tanto en periodo de terminación o en adultos jóvenes reproductores, expuestos a dosis infectantes relativamente altas de bacteria. De igual manera, Lawson y Gebhart, (2000) manifiestan que la forma aguda puede darse cuando se infectan los cerdos adultos que no habían tenido ningún contacto con *L. intracellularis*, o con dosis muy altas del agente, lo cual puede darse por ejemplo, en el momento en que cerdas de reposición sin ninguna inmunidad ingresan a un establecimiento sin haber sido sometidas a un adecuado proceso de aclimatación o confinadas en un ambiente muy contaminado.

En ocasiones las cerdas gestantes afectadas por esta forma clínica pueden abortar como consecuencia de la alteración del estado general y no por acción directa de la bacteria en el aparato genital, ya que es una infección restringida al aparato digestivo (Hardge *y col.*, 2005). Mauch y Bilkei, (2005b), estudiaron el desarrollo reproductivo de cerdas posterior a un brote de EPP, donde evidenciaron que de 93 cerdas, 21 de las

hembras con preñez avanzada presentaron diarrea sanguinolenta profusa, aborto, adelgazamiento, fiebre alta ($40,6 \pm 0,3$ °C) y postración 2 semanas después de iniciada la infección, 62 madres presentaron diarrea leve sin sangre ni fiebre y las hembras más viejas no presentaron ninguna manifestación clínica.

4. HALLAZGOS PATOLÓGICOS MACROSCÓPICOS

La lesión característica de la EPP, en cualquiera de sus formas de presentación clínica, es el engrosamiento de la mucosa intestinal, principalmente en la parte proximal del íleon debido a la proliferación de enterocitos, asociado con la presencia intracelular de *L. intracellularis* (Smith *y col.*, 2001; Gebhart, 2004a; McOrist *y col.*, 2006). Aunque a nivel de colon proximal, ciego y parte distal del yeyuno se han encontrado lesiones similares (Stevenson, 2001; Burch, 2000; Gebhart, 2004a).

La EPP o AIP es la manifestación más leve y frecuente de la enfermedad, ha sido observada en animales que se encuentran al final de la etapa de desarrollo o finalización, normalmente es posible encontrar la lesión a los 50cm terminales del intestino delgado y el tercio anterior del colón proximal. McOrist y Gebhart, (2000); Hardge *y col.*, (2005) describen que el aspecto reticular normal de la serosa intestinal se intensifica y que es posible encontrar un edema subseroso y mesentérico más o menos marcado, identificando un engrosamiento de la pared desde el lado externo.

Al interior del intestino Hardge *y col.*, (2005) evidenciaron que la mucosa de íleon puede presentarse húmeda y sin mucus, a veces con manchas de exudado inflamatorio ligeramente adherente, donde a su vez es evidente la presencia de pliegues profundos longitudinales y transversales en la mucosa que le dan un mayor grosor. Por su parte Joens *y col.*, (1997), Stevenson (2001), Busse (2004) y Guedes (2005) describieron el aumento del grosor de la mucosa intestinal como con una apariencia de pliegues echando ramas, donde a su vez la superficie de la mucosa puede encontrarse corroída dándole una apariencia granular o cerebroide.

En casos aún más leves la lesión puede verse en zonas aisladas de la mucosa del íleon, usualmente 10cm proximal de la válvula ileocecal (VIC), aunque en la mayoría de los casos se extienden afectando toda o casi toda la mucosa ileal. También es posible encontrar lesiones en el intestino grueso similares a las ya descritas, la cuales pueden aparecer extendidas o en forma de placas o pólipos separados (McOrist y Gebhart, 2000; Lawson y Gebhart, 2000).

Guedes (2005), encontró que las lesiones típicas de EPP pueden ser observadas a los 11 días pos infección en la mucosa del íleon y extenderse al ciego y colon tan solo a los 15 a 29 días pos inoculación, donde a su vez se hicieron evidentes las lesiones histopatológicas y la presencia de la bacteria a través de la técnica de inmunohistoquímica, lo que demostró que aparentemente todos los segmentos intestinales son susceptibles a la infección por *L. intracellularis*, a pesar de que el intestino grueso parezca ser infectado de forma más tardía en el transcurso de la enfermedad. En este mismo trabajo se señala la presencia del antígeno bacteriano en intestino, linfonódulos mesentéricos y esporádicamente en criptas tonsilares.

Por otra parte la complicación de las lesiones de la EPP o AIP pueden dar lugar a la presentación de la Enteritis Necrótica e Ileítis regional (Hardge *y col.*, 2005).

4.1. Enteritis necrótica

A menudo pueden producirse localmente infecciones bacterianas secundarias como la infección por *Salmonella spp* y otros agentes, los cuales pueden provocar cambios necróticos, degenerativos y reparativos cuando se superponen a la lesión proliferativa básica. Los cambios inflamatorios abarcan desde una reacción fibrosa superficial hasta una importante necrosis coagulativa y profunda, que constituye la lesión característica de la enteritis necrótica, este cuadro es habitual en los casos de enteropatía proliferativa grave observados en los cerdos de terminación en algunas granjas (Gebhart, 2004a; Hardge *y col.*, 2005).

Durante la Enteritis Necrótica frecuentemente se presenta una necrosis coagulativa, con marcada exudación inflamatoria sobrepuesta a una lesión establecida de enteropatía proliferativa, alguna veces es posible observar masas caseosas amarillentas o grisáceas muy adheridas a la mucosa engrosada, las cuales pueden tener partículas de alimento adheridas (McOrist y Gebhart, 2000; Hardge *y col.*, 2005).

4.2. Ileítis regional

A esta forma de lesión, se le denomina vulgarmente intestino de “manguera”, ya que el íleon adopta la apariencia contraída, lisa, casi rígida del intestino delgado bajo, de modo que al sujetar un trozo este se mantiene rígido, esta es una lesión muy orientativa, pero aparece en muy pocos casos de la enfermedad (Wilson *y col.*, 1986; McOrist y Gebhart, 2000; Hardge *y col.*, 2005).

Al abrir la luz del íleon, es posible apreciar la reducción de la luz intestinal y un gran engrosamiento de la pared con espesores que pueden llegar a los 0,5cm, a su vez la mucosa puede presentar ulceraciones que cubren porciones más o menos amplias de ésta (McOrist y Gebhart, 2000; Hardge *y col.*, 2005), generalmente tienen forma lineal, con islas o tiras de mucosa sobreviviente adyacentes (McOrist y Gebhart, 2000), las cuales suelen desarrollar una importante reacción tisular de granulación, provocando la infiltración de tejido fibroso e hipertrofia muscular en el íleon (Joens *y col.*, 1997; Hardge *y col.*, 2005).

Este tejido de granulación puede ser prominente pero la característica más significativa es la gran hipertrofia de las capas musculares externas, siendo su causa aún desconocida (McOrist y Gebhart 2000, Huerta *y col.*, 2003; Hardge *y col.*, 2005). Es necesario tener en cuenta que las lesiones dadas por los cuadros de enteritis necrótica e ileítis regional actualmente son las más raras de encontrar (McOrist y Gebhart 2000).

4.3. Enteropatía proliferativa hemorrágica

Este cuadro corresponde a la forma aguda de la enfermedad, que puede observarse en cerdos muertos de forma súbita o en sacrificados. Particularmente, en casos de muerte súbita se observa la aparición de heces oscuras con aspecto alquitranado o totalmente sanguinolentas o una mezcla de sangre y alimento digerido que ha salido del ano y un cadáver pálido (Lawson y Gebhart, 2000; Bakker *y col.*, 2000).

Las lesiones han sido observadas externamente en íleon terminal y colon, donde aparece engrosamiento de la pared y edema subseroso, mientras que en el interior del intestino, uno de los hallazgos típicos es la presencia de sangre líquida o de coágulos de sangre cilíndricos que llenan más o menos la luz intestinal del íleon, del colon o de ambos, así como un marcado engrosamiento hiperplásico de la pared (McOrist y Gebhart, 2000; Bakker *y col.*, 2000; Hardge *y col.*, 2005).

Las lesiones macroscópicas de la forma aguda o EPH se diferencian de la EPP solamente por la gran cantidad de sangre no digerida que puede encontrarse mezclada con otros exudados en la luz intestinal (Stevenson, 2001; Guedes 2005).

Pese a este hecho, los animales afectados por la enteritis necrótica pueden sufrir lesiones persistentes, lo que se evidencia a través de los intestinos engrosados que pueden presentar estos ejemplares a la edad normal de sacrificio (Hardge *y col.*, 2005).

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS

L. intracellularis se encuentra ampliamente distribuida en granjas porcinas de la República Argentina, siendo la diarrea una de las principales manifestaciones clínicas en animales en etapa de desarrollo y terminación.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

1. Establecer la presencia y distribución de *L. intracellularis* en granjas porcinas de la República Argentina.
2. Determinar la presencia y dinámica de la diarrea y su asociación con *L. intracellularis* en cerdos de granjas porcinas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar por PCR y ELISA la presencia de *L. intracellularis* en cerdos de granjas porcinas de la Argentina.
2. Determinar el perfil de la presencia de *L. intracellularis* por edad en cerdos de granjas de distintas provincias de la República Argentina.
3. Determinar si el hallazgo de diarreas es percibida por el productor en las granjas.
4. Caracterizar las diarreas observadas por edad y determinar la dinámica de las mismas.
5. Determinar la asociación entre la presencia de *L. intracellularis* y las características de las diarreas.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN DE ANIMALES Y GRANJAS

Con el objeto de detectar la prevalencia de *L. intracellularis* en granjas de la Argentina, considerando una prevalencia estimada del 80%, un nivel de confianza del 95% y un error del 15 %, se calculó un n muestral de 27 establecimientos. El tamaño de la muestra y ajuste por tamaño, fue realizado utilizando las formulas citadas por Thrusfield, (1990), para lo cual se consideró un censo de 280 establecimientos de ciclo completo en la Argentina según los datos del Grupo de Intercambio de Tecnología en Porcinos (GITEP, 2003). Una vez realizado el ajuste quedó un número de granjas a muestrear de 24, por lo tanto y basándose en estos datos si la prevalencia medida coincide con la esperada, entonces la prevalencia verdadera se esperó entre 59,7 – 94,3%.

Los establecimientos fueron seleccionados utilizando un método de muestreo por conveniencia según Thrusfield (1990), donde la condición para estar incluidos en la muestra, era contar con etapas productivas de parto a terminación y que su ubicación ayudará a cubrir las diferentes provincias de mayor producción porcina del país. Adicionalmente, para la selección de los establecimientos era necesario contar con la disponibilidad de los productores en participar en el proyecto. No se tuvo en cuenta si los establecimientos cursaban o tenían antecedentes de procesos diarreicos o entéricos en el momento de su elección,

Para definir el número de animales a muestrear en cada granja para determinar presencia o ausencia de cerdos positivos a las 8, 15, y 21 semanas de vida, y poder establecer el perfil serológico y por PCR de *L. intracellularis*, se muestrearon 10 animales por categoría, utilizando una confianza del 95% y una prevalencia estimada del 30%, resultando un total de 30 muestras por establecimiento.

Entre los meses de julio y octubre de 2006, se realizó un estudio de corte transversal, donde una vez coordinada con cada productor una fecha de visita, durante su desarrollo se registró el número de madres y una vez dentro del establecimiento, se ingresó a las salas que alojaban los animales de 8, 15 y 21 semanas de edad, comenzando por los más jóvenes. En cada una de dichas fajas etarias se realizó al azar la extracción de las respectivas muestras de sangre y materia fecal de 10 animales por categoría.

En cada granja, fueron seleccionados a conveniencia 3 animales que presentaran diarrea, los cuales fueron sacrificados piadosamente, con el fin de poder relacionar la presencia de lesiones en íleon y VIC con la presencia del agente detectado por la técnica de PCR en contenido de íleon, colon y raspado de mucosa de íleon.

2. TOMA DE MUESTRAS

2.1. Procedimiento para la toma de muestras de sangre

La realización de la toma de muestras de sangre para el diagnóstico de *L. intracellularis* se realizó en los animales alojados en los mismos corrales que fueron inspeccionados, los cuales fueron seleccionados al azar, sin tener en cuenta si presentaban o no diarrea.

La sangre se extrajo de la vena cava anterior, en el caso de los animales de 8 semanas de edad se emplearon agujas de 40 x 12mm, para la colecta los lechones fueron inmovilizados y colocados en posición de decúbito dorsal.

En cerdos de 15 y 21 semanas de edad se utilizaron agujas de 50 x 12mm, la sujeción del animal para la toma de la muestra se realizó por medio de un lazo o acial, manteniendo el animal en pie y con la cabeza extendida, dichas técnicas fueron realizadas como las describe Sobestiansky *et al.*, (1997, 1999 y 2005), el volumen total mínimo por muestra fue de 5 ml.

Las muestras fueron identificadas y se colocaron en una gradilla en un ángulo de 45° a temperatura ambiente, una vez finalizada la colecta las muestras fueron refrigeradas hasta la llegada al laboratorio del Departamento de Patología Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto donde fueron procesadas.

Dentro de las 18 horas de extraída la sangre (30 muestras por establecimiento), las muestras fueron centrifugadas a 750 x g por 10 min a 4°C y los sueros almacenados a -70°C hasta el momento de su procesamiento, el cual se realizó una vez se obtuvo la totalidad de sueros de los establecimientos muestreados para este trabajo.

2.2. Procedimiento para la toma de muestras de materia fecal

La colecta de las muestras de materia fecal se realizó de forma simultánea en los animales alojados en los mismos corrales inspeccionados, los cuales fueron seleccionados al azar, sin tener en cuenta si presentaban o no diarrea.

Foto 1. Toma de muestras de materia fecal.



Dichas muestras obtenidas de acuerdo con la técnica descrita por Sobestiansky *y col.*, (1997, 1999 y 2005) directamente del recto del animal, introduciendo los dedos protegidos con bolsa estéril, para estimular la defecación se masajeó repetitivamente la parte superior de la pared intestinal (Foto 1). El tamaño de la muestra colectada no fue menor a 8 gr de materia fecal, una vez obtenida la muestra la bolsa fue cerrada, identificada y refrigerada, hasta la llegada al laboratorio del Departamento de Patología Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto para su posterior procesamiento

2.3. Procedimiento para la observación de lesiones macroscópicas y toma de muestras de animales sometidos a necropsia

2.3.1. Observación de lesiones macroscópicas

En cada una de las granjas, fueron seleccionados 3 animales que tuvieran manifestaciones clínicas evidentes de diarrea, independiente de la edad. La necropsia fue dirigida solo a la cavidad abdominal, abordándose el intestino en su porción final a la altura del ciego. Una vez individualizada la VIC, se midieron aproximadamente unos 50 cm de íleon por delante de la VIC con lo que se determinó la porción de íleon a estudiar (Foto 2). En primer lugar se observaron y protocolizaron las lesiones macroscópicas que se encontraron en íleon y VIC.

El criterio para afirmar que existía una lesión en íleon fue, que se presentara al menos uno de los siguientes hallazgos patológicos: presencia de hiperemia en mucosa de íleon, apariencia de la mucosa corrugada, cerebroide o como toalla; presencia de engrosamiento de la mucosa; presencia de edema, moco, material necrótico o fibrina sobre la superficie de la mucosa del íleon y contenido de la luz intestinal del íleon con características acuosa, moco, material necrótico, fibrina, sangre digerida, sangre fresca, alimento no digerido, cremoso o pastoso.

En cuanto a las lesiones en VIC se estableció como lesión la presencia de cualquiera de estos hallazgos: presencia de hiperemia, apariencia lisa o corrugada de la

mucosa; presencia de engrosamiento de la mucosa y presencia de edema, moco, material necrótico, fibrina, úlceras, petequias en la superficie de la mucosa.

Los hallazgos realizados durante la necropsia fueron consignados en una hoja de observaciones y una vez recolectada la información en la respectiva ficha de campo esta fue consolidada en una hoja de Excel para su posterior análisis.

2.3.2. Toma de muestras de contenido de íleon y colon

Posteriormente se realizó un corte longitudinal en dichas estructuras y se tomó con una espátula plástica estéril aproximadamente 1,5 ml de contenido del íleon y colon el cual fue almacenado en un tubo tipo eppendorf estéril debidamente identificado. Las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su posterior procesamiento (Foto 2).

Foto 2. Proceso para la observación de lesiones macroscópicas y toma de muestras para procesar por la técnica de PCR de contenido de íleon, colon y mucosa de íleon en animales necropsiados.



Con el fin de tomar muestras de raspado de la mucosa del íleon y colon para evitar potenciales inhibidores que se encuentran en el contenido intestinal o materia fecal (Ladinig y col, 2009), se procedió a lavar la mucosa con solución fisiológica estéril.

Posteriormente con espátula de plástico estéril se raspó la superficie de la mucosa hasta obtener una muestra de aproximadamente 1 cm² y se colocó en tubo tipo eppendorf estéril, debidamente identificado, conteniendo solución PBS estéril para evitar la deshidratación de la muestra, la cual fue transportada refrigerada hasta el laboratorio, en donde fueron almacenadas a – 70°C antes de las 12 a 24 horas posteriores a la colecta para la posterior extracción del ADN.

3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.1. Procesamiento de las muestras de suero

Para detectar la presencia de anticuerpos contra *L. intracellularis* se utilizó el kit comercial ELISA (Enterisol® Ileitis-ELISA), elaborado y donado por Boehringer-Ingelheim, Ingelheim – Alemania, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Los reactivos se prepararon y climatizaron para su uso a temperatura ambiente entre 18 a 25°C. Cada uno de los pocillos de las placas *microtiter* de reacción destinados a las muestras y sueros de control fueron llenados con 90µl de la solución tamponada de dilución muestra/conjugado. Posteriormente, fueron llenados los pocillos de reacción apropiados con 10µl de suero control positivo y negativo, los cuales fueron usados por duplicado, las placas fueron cuidadosamente mezcladas, agitadas y selladas por tiras e incubadas a 37°C durante 60 minutos.

Finalizada la incubación los pocillos fueron vaciados y lavados tres veces con la respectiva solución de lavado, cada pocillo de reacción fue llenado con 100µl de conjugado anti-*Lawsonia*-mAb-HRP e incubado nuevamente a 37°C durante 60 minutos y luego sometido a un nuevo proceso de lavado. Seguidamente fueron añadidos 100µl de solución de sustrato a cada pocillo de reacción e incubados a temperatura ambiente (18 a 25°C) durante 10 minutos, el tiempo fue medido a partir del mismo momento en que fue llenado el primer pocillo de reacción, posteriormente se adicionaron 50µl de la

solución de frenado en cada pocillo de reacción siguiendo el orden con el que se añadió la solución de sustrato (Foto 3).

Foto 3. Placas de ELISA procesadas para la prueba serológica.



Finalmente, se realizó la medición de los valores de densidad óptica (DO) de las muestras de suero y controles por medio del fotómetro con filtros de 450 nm de marca Labsystem. Para la interpretación de los resultados suministrados por el lector, se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición (PI)} = \frac{\text{DO Control Neg.} - \text{DO Control Pos./ muestra}}{\text{DO control Neg.}} \times 100$$

La prueba se consideró válida toda vez que el valor de PI del Suero control positivo fue mayor a 40 y el valor de PI del suero control positivo fue mayor a 0,5.

Los sueros cuyos valores de densidad óptica (DO) fueron mayores a las del punto de corte (PI > 30) fueron considerados positivos, el resto negativos.

3.2. Procesamiento de las muestras de materia fecal, contenido de íleon y colon y raspado de mucosa de íleon

3.2.1. Extracción de ADN de muestras de materia fecal, contenido de íleon y colon

El ADN de la materia fecal de los animales de 8, 15 y 21 semanas de edad y el ADN del contenido de íleon y colon de los animales necropsiados fue extraído empleando el Kit comercial QIAamp stool mini kit (Qiagen, Duesseldorf, Alemania), siguiendo las especificaciones del fabricante (Foto 4).

Foto 4. Kit comercial QIAamp stool mini kit (Qiagen, Duesseldorf, Alemania), empleado para la extracción de ADN.



Las muestras de materia fecal fueron sometidas a un proceso de descongelación a temperatura ambiente. Para cada muestra se obtuvo una porción de 180 a 220 mg de materia fecal por medio del uso de una espátula plástica descartable y estéril, cada muestra fue colocada por separado en un tubo tipo eppendorf limpio y estéril de 1,5 ml.

Una vez se adicionaba la muestra en los tubos éstos fueron inmediatamente puestos sobre hielo donde simultáneamente se les adicionó 1400µl de Buffer ASL. Posteriormente cada tubo fue agitado (usando un agitador vortex) durante 1 min. o hasta que la muestra se disolviera totalmente. La suspensión se incubó durante 5 min. a 70°C en baño maría y fueron nuevamente agitados por 15 seg.

Las muestras fueron centrifugadas a 14.000 r.p.m. por un min siendo transferidos 1200µl del sobrenadante a un tubo nuevo al que se le adicionó una tableta de inhibitEX, seguidamente se procedió a agitar por vibración cada tubo hasta diluir y homogenizar cada muestra, las cuales fueron incubadas por 1 min a temperatura ambiente y centrifugadas nuevamente a 14.000 r.p.m. por 3 min.

Simultáneamente, en un tubo tipo eppendorf nuevo y estéril fueron colocados 15µl de Proteinasa K, sobre la cual se adicionó 200µl de sobrenadante resultante de la centrifugación y 200µl de Buffer AL siguiendo siempre este estricto orden; el contenido fue nuevamente agitado durante 15 seg e incubados a 70°C por 10 min.

Pasado este tiempo fueron adicionados 200µl de etanol al 100% (frío) seguido nuevamente de un proceso de agitación. El contenido final de cada muestra fue transferida a un tubo nuevo QIAamp Spin Column® teniendo la precaución de no mojar los bordes. Una vez realizada la transferencia éstos fueron centrifugados a 14.000 r.p.m. por 1 minuto y transferida la columna a otro tubo nuevo QIAamp®. Posteriormente a cada tubo se le adicionaron 500µl de Buffer AW1 para que fuesen nuevamente centrifugados a 14.000 r.p.m. por 1 min. Nuevamente se transfirió la columna a otro tubo nuevo QIAamp® y se colocaron 500µl de Buffer AW2 los cuales fueron centrifugados a 14.000 r.p.m. por 3 min.

Finalmente se transfirió la columna a otro tubo nuevo QIAamp® al cual se le añadieron 100µl de Buffer AE directamente sobre la membrana, y se incubaron por 1 min a temperatura ambiente para luego centrifugarlos por 1 min a 14.000 r.p.m.

Una vez finalizada la extracción, el ADN fue almacenado en tubos tipo eppendorf de 1,5ml a -20°C, hasta el proceso de amplificación.

3.2.2. Extracción de ADN de las muestras de raspado de mucosa del íleon

El ADN de las muestras de raspado de la mucosa del íleon de los animales necropsiados fue extraído utilizando el kit comercial DNAzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de fabricante. Previamente, el raspado de la mucosa fue colocado en mortero de porcelana estéril y guardado a -70°C y posteriormente rociado con nitrógeno líquido. Cuando el raspado presentaba una consistencia dura, el mismo fue pulverizado con el pilón del mortero (también estéril). Una vez pulverizado cada uno de los raspados, se esperó a que tomaran temperatura ambiente (y consistencia líquida) y posteriormente el ADN se extrajo según las instrucciones de la siguiente manera:

- 1- Se transfirió 1 ml del contenido de cada mortero a tubo estéril de 1,5 ml.
- 2- Se centrifugó a 13.000 r.p.m. por 10 min a 4°C.
- 3- Se agregó 1 ml de DNAzol.
- 4- Se mezcló con pipeta.
- 5- Se centrifugó a 13.500 r.p.m. por 10 min a 4°C.
- 6- Se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril de 1,5 ml.
- 7- Se agregaron 500µl de etanol al 100 %.
- 8- Se incubó por 2 horas a -20°C.
- 9- Se centrifugó a 13.900 r.p.m. por 4 min. a 4°C.
- 10- Se descartó el sobrenadante.
- 11- Se agregaron 1000µl de etanol al 75%.
- 12- Se invirtió el tubo de 3 a 6 veces.
- 13- Se centrifugó a 13.900 r.p.m. por 4 min. a 4°C.
- 14- Se descartó el sobrenadante.
- 15- Se agregaron 1000µl de etanol al 75%.
- 16- Se centrifugó a 13.900 r.p.m. por 4 min. a 4°C.

- 17- Se dejó el tubo invertido abierto sobre papel *tissue* para que escurra.
- 18- Se agregaron 20µl de agua y se pipeteó hasta disolver el pellet.
- 19- Se guardó a -20 °C, hasta el momento de procesarlo por PCR.

3.2.3. Amplificación del ADN

Para la detección de *L. intracellularis* por PCR se amplificó un fragmento del gen *lyase-like*, obteniendo un amplímero de 319 pb. Para ello se utilizaron los cebadores (A: 5' TATGGCTGTCAAACACTCCG 3', B: 5' TGAAGGTATTGGTATTCTCC 3') y condiciones descriptos por Jones *y col.*, (1993a y b).

La reacción fue realizada en un ciclador térmico Techne (Genius, Vermont, Estados Unidos de Norte América) con una etapa inicial de 95°C por 15 min., luego 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 56°C por 2 min. y 72°C por 30 seg. seguida de una extensión final de 72°C por 7 min., usando 5µl de ADN templado en un volumen final de 25µl conteniendo: 0,2mM de cada dNTPs, 0,6µM de cada cebador, 1,5mM de Mg Cl₂ y 1 U de Taq (Platinum® Taq DNA Polimerasa, Invitrogen, Argentina).

Cada cinco muestras, se incluyó como control negativo el coctel sin muestras de ADN y cada quince muestras, se usó como control positivo de la reacción, ADN de *L. intracellularis* extraído de la vacuna viva de Ileítis (Enterisol® Ileitis Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Alemania) que se incluía en la última posición.

Para minimizar el riesgo de contaminación, cada paso de la PCR fue realizado en habitaciones separadas. El producto de la PCR fue corrido en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0,5µgrs/ml) a 70 V por 1 hora aprox. y visualizado en un transiluminador (Cole Palmer®)

4. PROTOCOLOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS Y LA CARACTERIZACIÓN DE LAS DIARREAS

El trabajo de campo fue realizado por el mismo grupo de profesionales, quienes desarrollaron un procedimiento único para la realización de la visita la cual contaba con una duración de aproximadamente 5 horas, la cual podría variar de acuerdo con el tamaño y tipo de sistema de producción de cada establecimiento. Se tuvo en cuenta mantener una cuarentena de por lo menos 48 horas previo a cada visita y un protocolo de bioseguridad para la preparación del equipo, el cual fue sometido a cuidadosos procesos de desinfección.

Para la realización del presente trabajo se desarrolló una encuesta con el objeto de coleccionar los datos de cada granja incluida en este estudio (Figura 1). Dicha encuesta fue aplicada al personal a cargo de los animales en cada faja etaria al que denominaremos dentro del trabajo como **productor**, al inicio de la visita y en donde se pregunta si el productor observaba diarrea en cerdos de 8, 15 y 21 semanas de edad, dato al que se le denominó **percepción** del productor a la presentación de diarreas en los cerdos.

Para la obtención de datos que permitieran la caracterización de las diarreas, previo a la salida a campo, se desarrolló un protocolo gráfico y se estableció un acuerdo entre los observadores que realizarían la respectiva evaluación, con el fin de establecer parámetros de referencia a través de una escala de calificación de dos características principalmente: Color y consistencia.

Color: Para su calificación se adaptó inicialmente una tabla de colores, a partir de una muestra de color de pinturería como lo muestra la foto 5.

Figura 1. Encuesta para la colecta de datos

Fecha:	Ha tenido problemas de diarreas en el establecimiento en cerdos de 8 ___ 15 ___ o 21 ___ semanas.
Establecimiento:	
Número de Madres:	Observaciones
Total de Animales: 8 semanas _____ 15 semanas _____ 21 semanas _____	
Animales por corral: 8 semanas _____ 15 semanas _____ 21 semanas _____	

Foto 5. Tabla de colores inicialmente desarrollada a partir de una muestra de pinturería para la caracterización de diarreas por color.



La cual posteriormente fue ajustada con hallazgos obtenidos en campo con la ayuda de una cámara digital HP Photosmart M23 y las referencias dadas por los profesionales veterinarios experimentados pertenecientes al grupo de investigación que desarrolló el presente trabajo, con lo cual se logró finalmente establecer la tabla de categorización que se presenta a continuación (Tabla 1):

Consistencia: Esta característica fue evaluada a partir de una escala elaborada por Sobestiansky y col., (1997, 1999) y adecuada con imágenes obtenidas durante el trabajo de campo, de igual forma a la realizada con la escala de color, generándose finalmente la escala que se muestra en la tabla 2.

Se elaboró una ficha de campo (Figura 2) para la colecta de datos para la caracterización de la diarrea observada durante la inspección realizada en el presente trabajo y el cual se denominará de ahora en adelante como **inspección**.

Una vez recolectada la información en la respectiva ficha de campo esta fue consolidada en una hoja de Excel para su posterior análisis.

Tabla 1. Caracterización de las diarreas por color

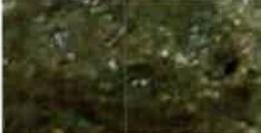
N°	Color	
1	Amarillo	
2	Amarillo verdoso	
3	Gris verdoso	
4	Marrón	

Tabla 2. Caracterización de las diarreas por consistencia

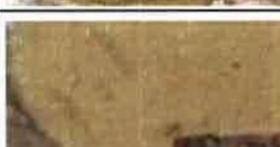
Nº	Consistencia	
0	Normal	
1	Pastosa	
2	Cremosa	
3	Líquida	

Figura 2. Ficha de campo para la caracterización de las diarreas.

Edad de los animales	Color de la diarrea	Consistencia de la diarrea	Número de animales con diarrea
8 semanas			
15 semanas			
21 semanas			
ESCALA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA DIARREA			
COLOR		CONSISTENCIA	
Amarillo	1	Normal	0
Amarillo Verdoso	2	Pastosa	1
Gris Verdoso	3	Cremosa	2
Marrón	4	Líquida	3

5. RECOLECCIÓN DE DATOS Y MUESTRAS

Con el fin de realizar la inspección, la obtención de datos y la toma de muestras (siempre comenzando por los animales más jóvenes hacia los de más edad) la metodología utilizada fue la siguiente:

- a. Ingreso a las respectivas áreas de alojamiento y observación de los animales desde fuera del corral y detección de evidencias de diarreas en el piso, paredes y periné de los cerdos.
- b. Ingreso al corral e incitación de los animales a levantarse y desplazarse, para lograr una mejor inspección del suelo y periné, y estímulo del reflejo de defecación.
- c. Identificación y conteo con la ayuda de una tiza de cera de los animales con diarrea (Foto 6).
- d. Simultáneamente se procedió a la caracterización de las diarreas de acuerdo con la escala desarrollada, labor durante la cual se calificaron las diarreas de forma poblacional más no individual y la información se fue consignando en la respectiva ficha de campo previamente presentada (Figura 2).

Foto 6. Proceso de inspección y conteo de animales con diarrea.



El anterior procedimiento fue ejecutado por 2 profesionales del grupo quienes, en todas las visitas realizaron dicha calificación previa estandarización de los conceptos de calificación de cada una de las características. El tiempo de duración de cada inspección fue de aproximadamente 20 min. por grupo etario.

Una vez recolectada la información en la respectiva ficha de campo esta fue consolidada en una hoja de Excel para su posterior análisis.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se determinó la prevalencia de granjas positivas a *L. intracellularis* por serología y por PCR, realizándose un intervalo de confianza al 95% exacto para una proporción, cuando el n muestral es menor que 100.

Se determinó la distribución de la presencia del agente (en cerdos de cualquier edad) por provincias por serología y por PCR, además de la prevalencia intra-granjas, considerando sólo el muestreo de la semana 21.

Para obtener el perfil de *L. intracellularis*, se determinó la frecuencia de animales positivos por serología y PCR para cada faja etaria, para ello se utilizó como denominador el total de sueros y materia fecal testeados para cada edad de los establecimientos positivos. Se compararon los resultados de serología y PCR para determinar momento de detección de cada una de las técnicas utilizadas. Para el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS Versión 11.5.1. 2002.

Para determinar la concordancia entre el número de establecimientos y la percepción e inspección de diarreas en animales de 8, 15 y 21 semanas de edad se realizaron tablas de contingencia para cada edad. Se realizó lo mismo sólo para aquellos establecimientos que fueron PCR positivos.

Para determinar la concordancia entre la presencia de lesiones macroscópicas en íleon y VIC *versus* PCR positivo en muestras de contenido intestinal y de raspado de mucosa de íleon en los animales necropsiados, se realizaron tablas de contingencia para: lesión en íleon y PCR de contenido de íleon, lesión en íleon y PCR de mucosa del íleon y lesión en VIC y PCR de contenido de colon. De igual manera, se realizó una tabla para analizar la relación entre la sensibilidad, especificidad y valores predictivos específicos entre las técnicas de diagnóstico de PCR para *L. intracellularis* y la presencia de lesiones macroscópicas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Para la etapa de presentación y perfil de *L. intracellularis* por serología se trabajó con muestras de sangre de 22 establecimientos, procesándose un total de 650 sueros, debido a dificultades de trabajo en una de las granjas muestreadas en donde no fue posible obtener 10 sueros de animales de 21 semanas de edad.

Para la evaluación de presencia de *L. intracellularis* por PCR al final del estudio, no fue viable el procesamiento de la totalidad estimada de muestras de materia fecal (650), por lo que se procesaron 630 muestras (210 para cada faja etaria), en cuanto a los animales sometidos a necropsia se procesó un total de 59 animales de los 66 proyectados para las 22 granjas, debido a que algunos productores no accedieron al sacrificio de sus animales.

En la caracterización de diarreas incluyendo percepción e inspección se analizó información de un total de 21 granjas debido a dificultades en una granja para responder la respectiva encuesta por ausencia del productor.

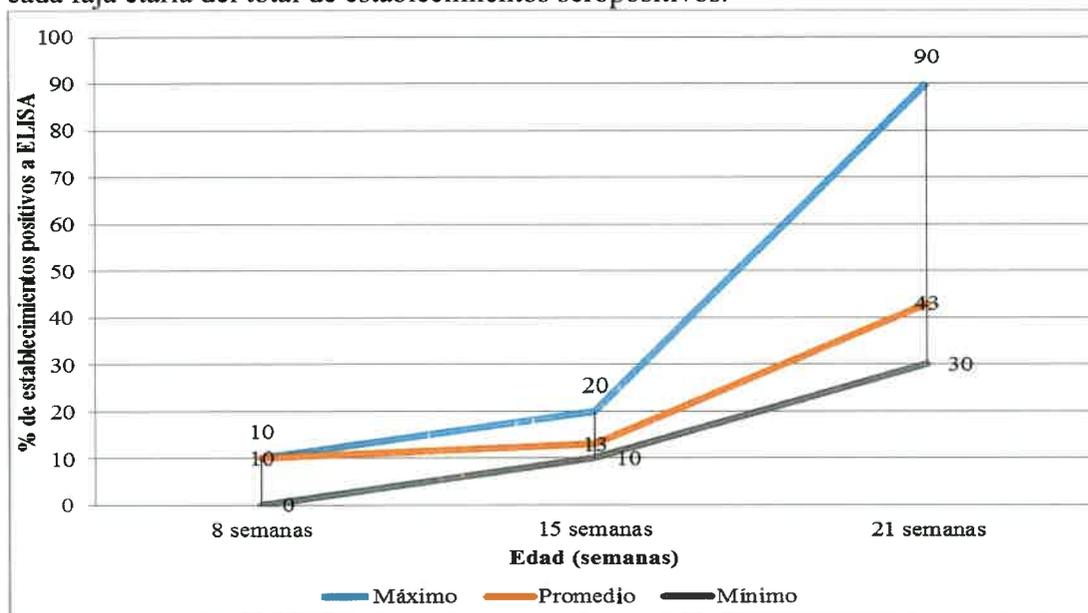
Las granjas de las que finalmente se obtuvieron las muestras se encontraban distribuidas de la siguientes manera: seis en la provincia de Córdoba, cinco en la provincia de Buenos Aires, cuatro en Santa Fe, dos en Tucumán, dos en Entre Ríos, uno en La Pampa, uno en San Juan y uno en San Luis; abarcando el muestreo las siete provincias de mayor producción porcina del país. El promedio de madres del total de granjas fue de 810 con un mínimo de 100 y un máximo de 4200.

1. PERFIL SEROLÓGICO DE *L. intracellularis*

Al realizar el análisis para establecer el perfil serológico de *L. intracellularis*, se encontró que en el muestreo de las 8 semanas de edad se detectó en 7 establecimientos

sólo 1 animal seropositivo en cada uno de ellos, entre 1 y 2 en 10 establecimientos a las 15 semanas y entre 3 y 9 fueron a las 21 semanas de edad en 18 granjas. La frecuencia promedio (y valores máximos y mínimos) para cada faja etaria se muestran en el gráfico 1.

Gráfico 1. Perfil serológico, frecuencia promedio y valores máximos y mínimos, para cada faja etaria del total de establecimientos seropositivos.



De los 21 establecimientos muestreados, veinte (90,9%), IC 95% (70 - 98,8) fueron positivos por ELISA. La prevalencia por serología media intra predial obtenida, sin tener en cuenta la edad, fue del 14,7% con un IC 95% (10,5 - 18,8).

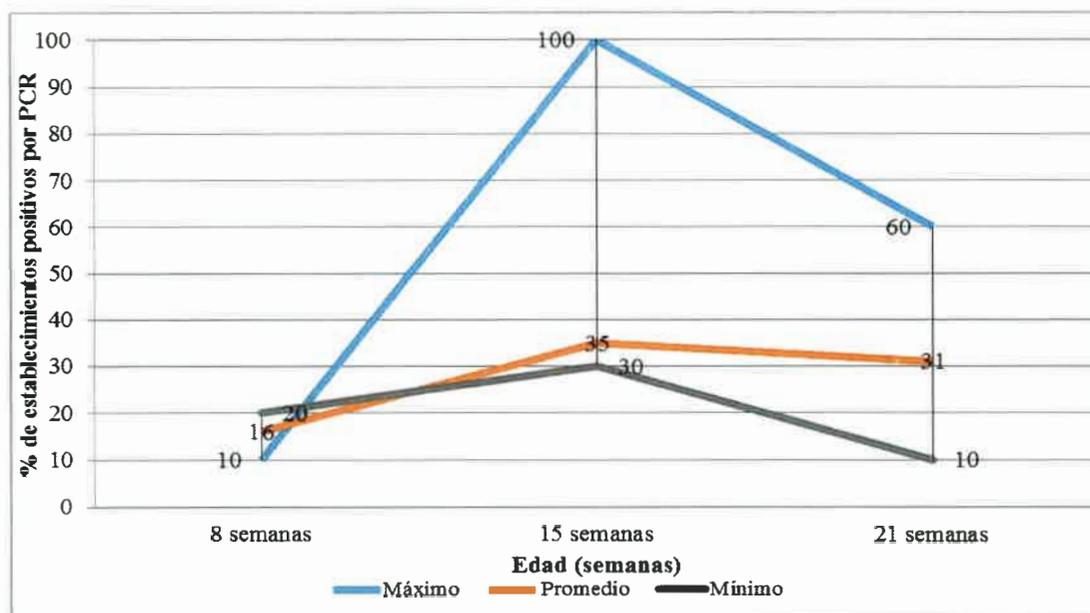
En todas las provincias se encontraron establecimientos seropositivos a *L. intracellularis*: Córdoba 100% (6/6), Buenos Aires 100% (5/5), Santa Fé 100% (4/4), Tucumán 50% (1/2), Entre Ríos 50% (1/2), La Pampa 100% (1/1), San Juan 100% (1/1) y San Luis 100% (1/1).

2. PERFIL DE PCR DE *L. intracellularis*

De los 21 establecimientos considerados, 12 (57%), IC 95% (36 – 78) resultaron positivos. La prevalencia intrapredial media obtenida empleando la técnica de PCR fue del 8,6% con un IC 95% (3,1 – 14,1).

En los muestreos de 8, 15 y 21 semanas de edad, se encontraron 5, 21 y 30 muestras de materia fecal positivas en 3, 6 y 10 establecimientos respectivamente. La frecuencia promedio (y valores máximos y mínimos) para cada faja etaria se muestran en el gráfico 2. Los resultados de PCR positivos por provincias fueron los siguientes: Córdoba 50% (3/6), Buenos Aires 60% (3/5), Santa Fé 50% (2/4), Tucumán 100% (1/1), Entre Ríos 50% (1/2), La Pampa 100% (1/1), San Juan 100% (1/1) y San Luis 0% (0/1).

Gráfico 2. Perfil por la técnica de PCR, frecuencia promedio y valores máximos y mínimos para cada faja etaria del total de establecimientos positivos.



3. PRESENCIA DE *L. intracellularis*

Al evaluar la presencia de *L. intracellularis* entre la población muestreada por la técnica de PCR se encontró que de las 210 muestras procesadas por la técnica de PCR para materia fecal el 14,8 % (31/210) de éstas presentaron un mayor porcentaje de muestras positivas en la faja etária de las 21 semanas, seguido por el 10% y 2,3% de muestras para las categorías de 15 y 8 semanas respectivamente. Con respecto al comportamiento entre animales positivos y granjas positivas para cada edad de animales evaluada en el presente estudio, se encontró una relación que indica que se presentan 3,5 animales positivos en las granjas positivas a las 15 semanas de vida , 3,1 animales positivos en granjas positivas a las 21 semanas y 1,6 animales positivos en granjas positivas por PCR a las 8 semanas, (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de muestras positivas por la técnica de PCR a *L. intracellularis* en el total de muestras procesadas y relación de animales positivos por granja PCR positivas por edad.

Edad de los Animales	Porcentaje de Muestras PCR Positivas en Materia Fecal *	Relación de Animales Positivos por PCR vs Granjas PCR Positivas por Edad **
8 Semanas	2,3% (5/210)	1,6 (5/3)
15 Semanas	10,0% (21/210)	3,5 (21/6)
21 Semanas	14,8% (31/210)	3,1 (31/10)

*Muestras positivas por PCR / Número total de muestras de Materia Fecal procesadas por PCR.

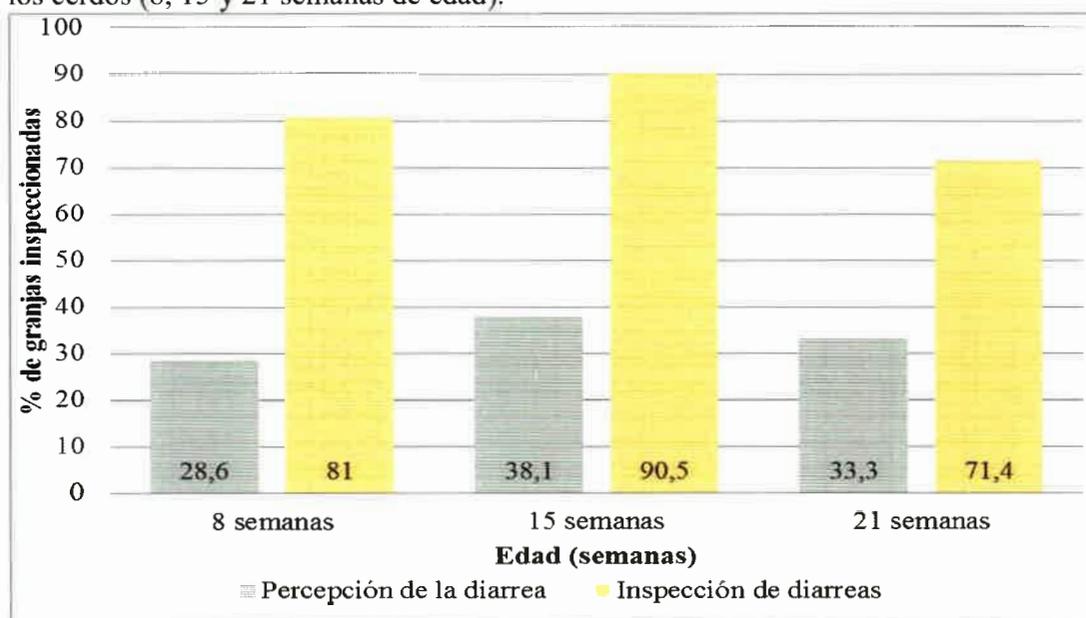
**Número de animales positivos por PCR por edad / Número de granjas positivas al PCR por edad.

4. PERCEPCIÓN E INSPECCIÓN DE DIARREAS

La proporción de establecimientos en los que la diarrea fue **inspeccionada** fue, en todas las edades muestreadas, siempre mayor a la proporción de establecimientos en los que la diarrea fue **percibida**. En el muestreo de las 15 semanas, tanto la **inspección**

como la **percepción** de las diarreas fueron mayores al de los otros muestreos con porcentajes del 90,5% (19/21) y 38,1% (8/21) respectivamente (Gráfico 3). El porcentaje de establecimientos positivos a la **percepción** de diarrea a las 21 semanas de edad fue del 33,3% (7/21) y el porcentaje de establecimientos positivos a la **inspección** fue de 71,4% (15/21). A las 8 semanas de edad, el porcentaje de establecimientos en donde la **inspección** fue positiva fue del 81% y el porcentaje de establecimientos positivos a la **percepción** fue del 28,6% (6/21) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Porcentaje de granjas en que la diarrea fue percibida por el productor *versus* porcentaje de establecimientos en los que la diarrea fue inspeccionada según la edad de los cerdos (8, 15 y 21 semanas de edad).



Para un análisis más profundo de la **percepción** *versus* la **inspección** de la diarrea a nivel de establecimientos, se realizaron tablas de concordancia entre lo percibido y lo inspeccionado en cada edad de muestreo. Así, en el muestreo de las 8 semanas de edad la concordancia entre la **percepción positiva** del productor y la **inspección positiva** de la diarrea se dio en el 83,3% (5/6) de los establecimientos. La concordancia entre la **percepción negativa** y la **inspección positiva** se observó en el 80% (12/15) de los establecimientos. La concordancia entre **inspección positiva** y

percepción negativa se presentó en el 29,4% (5/17) de las granjas. Por último, la concordancia entre **inspección negativa** y **percepción negativa** se observó en el 25% (1/4) de los establecimientos (Tabla 4).

Tabla 4. Concordancia entre el número de establecimientos en los cuales se observó diarrea en la inspección *versus* lo percibido por el productor a las 8 semanas de edad.

<i>8 Semanas</i>	INSPECCIÓN		TOTAL
	POSITIVA	NEGATIVA	
POSITIVA	5	1	6
NEGATIVA	12	3	15
TOTAL	17	4	21

En el muestreo de las 15 semanas de edad, la concordancia entre el número de establecimientos en los que la diarrea fue **percibida** *versus* la **inspección positiva** se dio en el 100 % (8/8) de los casos. La concordancia entre la **percepción negativa** y la **inspección positiva** se dio en el 84,6% (11/13) de los establecimientos. La **inspección positiva** y la **percepción negativa** de la diarrea coincidieron en el 42,1% (8/19) de los casos. No hubo concordancia entre **inspección negativa** y la **percepción negativa** (0% -0/2). Estos resultados están resumidos en la tabla 5.

Tabla 5. Concordancia entre el número de establecimientos en los cuales se observó diarrea en la inspección *versus* lo percibido por el productor a las 15 semanas de edad.

<i>15 Semanas</i>	INSPECCIÓN		TOTAL
	POSITIVA	NEGATIVA	
POSITIVA	8	0	8
NEGATIVA	11	2	13
TOTAL	19	2	21

Finalmente, en el muestreo de las 21 semana la concordancia entre el número de establecimientos en los que la **percepción** fue **positiva** y la **inspección** fue **positiva** en el 71,4% (5/7) de los casos. La concordancia entre **percepción negativa** e **inspección**

positiva se presentó en el 71,4% (10/14) de las granjas. La **inspección positiva** y la **percepción negativa** se observó en el 33,3% (5/15) de los casos. El mismo porcentaje de establecimientos 33,3% (2/6) coincidieron en cuanto a la **inspección negativa** y la **percepción negativa** de diarrea. Estos resultados están resumidos en la tabla 6.

Tabla 6. Concordancia entre el número de establecimientos en los cuales se observó diarrea en la inspección *versus* lo percibido por el productor a las 21 semanas de edad.

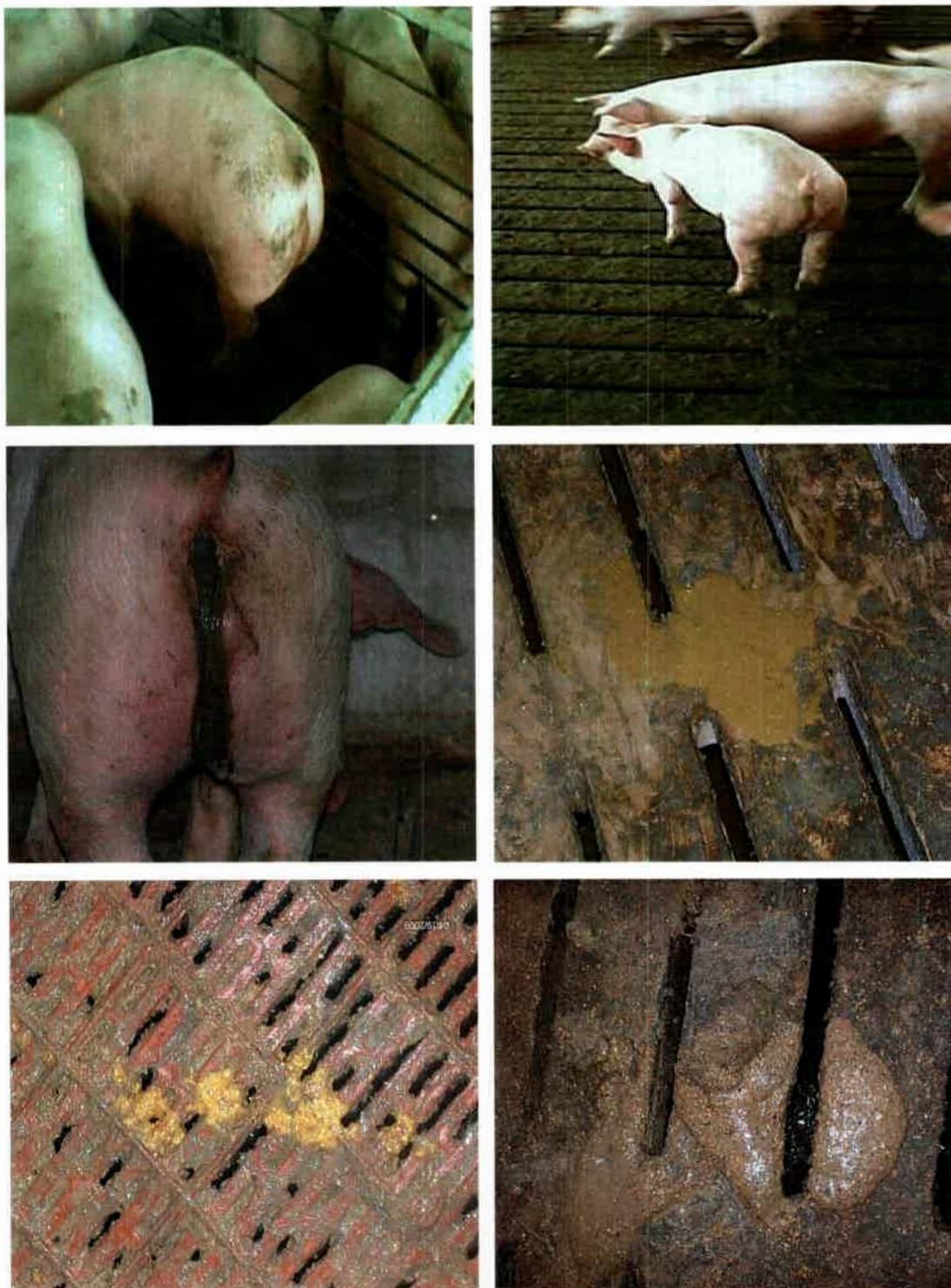
21 semanas	INSPECCIÓN		TOTAL
	Positiva	Negativa	
PERCEPCIÓN			
Positiva	5	2	7
Negativa	10	4	14
Total	15	6	21

Independientemente de la cantidad de establecimientos, también fue calculada la proporción (porcentaje) de las diarreas inspeccionadas respecto a la edad de los animales. Se observó que el porcentaje de diarreas se mantuvo en las dos primeras fajas etarias con un 2,2 % a las 8 y 15 semanas de edad y se redujo al 1,5 % a las 21 semanas de edad. En la tabla 7 se muestran estos resultados de manera resumida, los cuales se exponen en forma desglosada por edad y por establecimiento en los anexos 1, 2 y 3. En la foto 7 se muestran algunos ejemplos de las diarreas observadas durante la visita.

Tabla 7. Datos consolidados por edad de la población analizada, número de diarreas observadas a la inspección y porcentaje de diarreas.

Edad de los animales	Total de animales	Nº de diarreas observadas	% Diarrea
8 Semanas	5991	136	2,2
15 Semanas	7289	163	2,2
21 Semanas	7725	116	1,5
TOTAL	21005	415	1,9

Foto 7. Ejemplos de diarrea observadas en los animales durante la inspección realizada en los distintos establecimientos visitados.



5. CARACTERIZACIÓN DE LAS DIARREAS

Para caracterizar las diarreas se utilizaron como parámetros la consistencia y el color de las mismas, la inspección realizada en los animales de 8, 15 y 21 semanas de edad, permitió el hallazgo de diarreas con diferentes características (Foto 8). La cantidad de tipos de cada una de las diarreas observadas en cuanto a consistencia y color respecto al total de observadas se muestra de manera resumida en la tabla 8, en donde de 415 diarreas se encontró que las de consistencia cremosa (243) se presentaron en mayor proporción, seguidas de las líquidas (133) y en cuanto al color las grises verdosas predominaron (256) seguidas por las amarillas verdosas (120). Los resultados desglosados por edad se muestran en los anexos 1, 2 y 3.

Tabla 8. Caracterización de diarreas inspeccionadas en animales de 8, 15 y 21 semanas de edad.

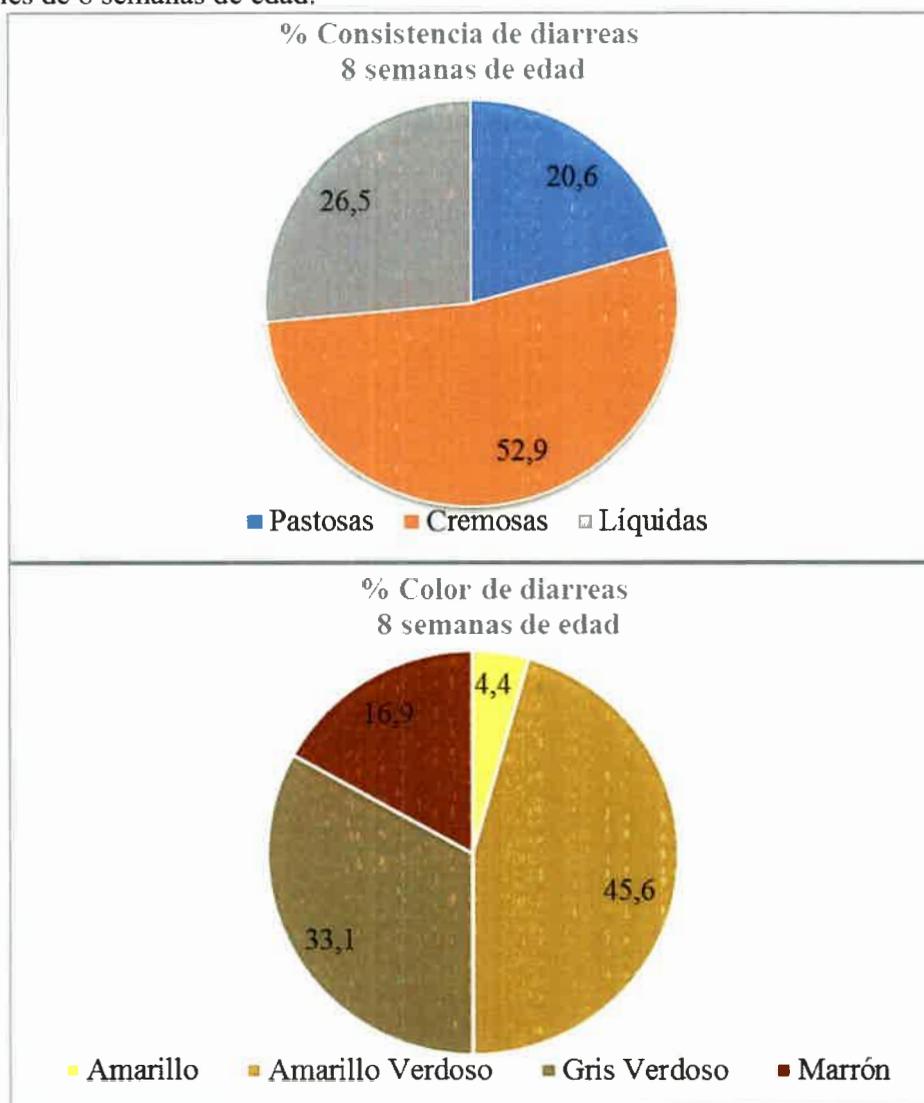
Edad	Consistencia				Color				
	Pastosa	Cremosa	Líquida	Total	Amarillo	Amarillo Verdoso	Gris Verdoso	Marrón	Total
8 Semanas	28	72	36	136	6	62	45	23	136
15 Semanas	7	93	63	163	7	48	108	0	163
21 Semanas	4	78	34	116	1	10	103	2	116
TOTAL	39	243	133	415	14	120	256	25	415

Foto 8.Colores y consistencias de diarreas observadas y caracterizadas durante la inspección.



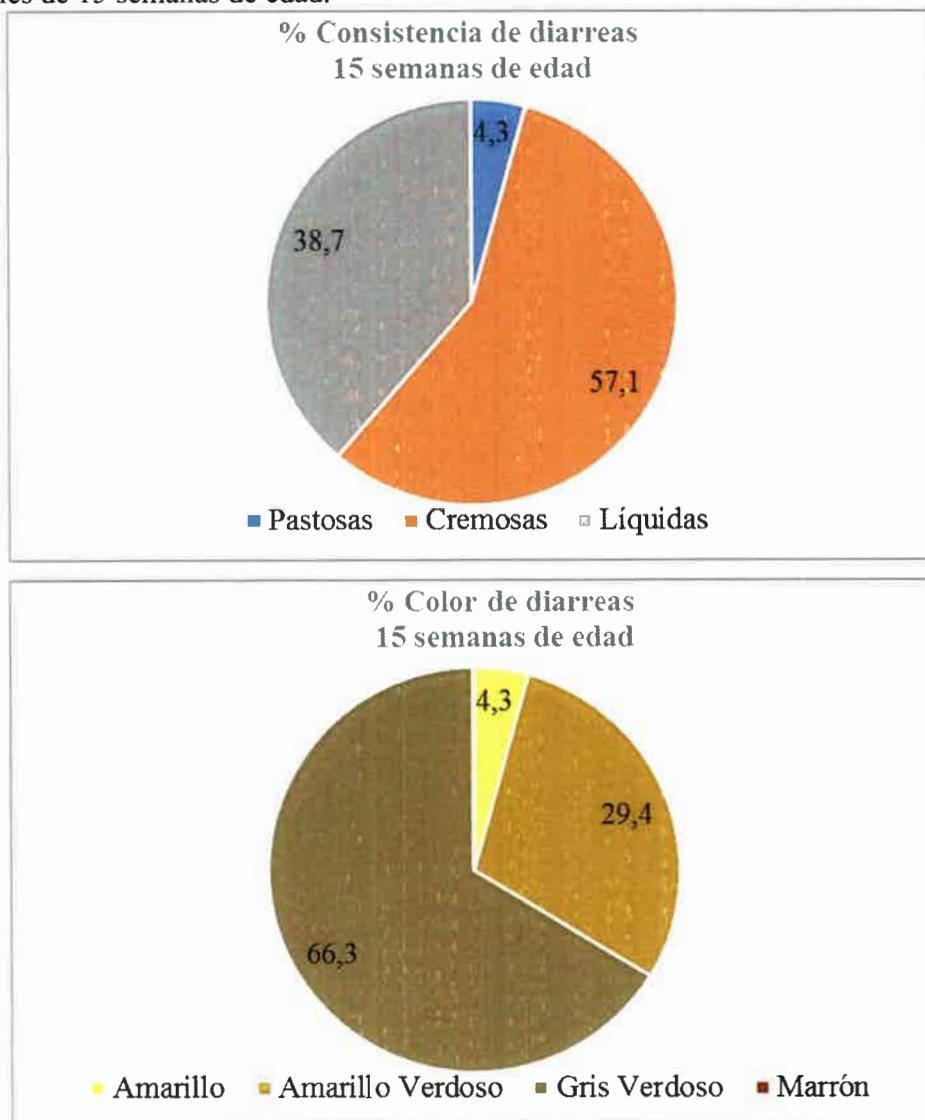
En cuanto a los porcentajes de presentación de las características de las diarreas evaluadas, para los animales de 8 semanas de edad el porcentaje de diarreas con consistencia cremosa fue el más encontrado con un 52,9% (72/136), seguidas por las líquidas con un 26,5% (36/136) y por último las pastosas con el 20,6% (28/136), (Gráfico 4). En cuanto a la presentación de colores en animales de esa misma edad, el color amarillo verdoso fue el de mayor presentación 45,6% (62/136), seguida del gris verdoso con 33,1% (45/136), marrón 16,9% (23/136) y amarillo 4,4% (6/136), (Gráfico 4).

Gráfico 4. Porcentaje de consistencias y colores de las diarreas inspeccionadas en animales de 8 semanas de edad.



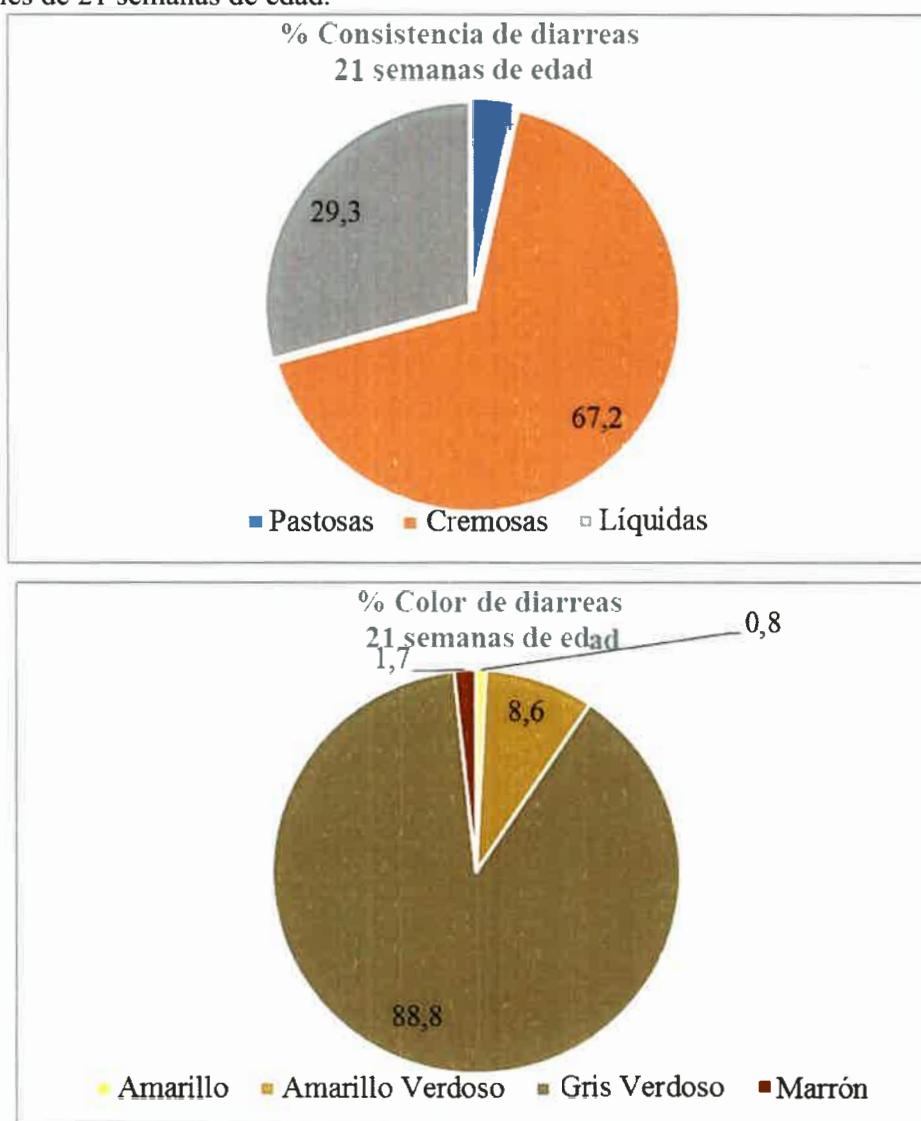
En los animales de 15 semanas de edad el porcentaje de diarreas con consistencia cremosa continuó siendo el de mayor presentación: 57,1% (93/163), seguidas por las líquidas con un 38,7% (63/163) y por último las pastosas con una marcada reducción de 4,3% (7/163). Los colores de las diarreas halladas en los cerdos de 15 semanas fueron de mayor a menor presentación: gris verdoso 66,3% (108/163), amarillo verdoso 29,4% (48/163) y amarillo 4,3% (7/163) (Gráfico 5).

Gráfico 5. Porcentaje de consistencias y color de las diarreas inspeccionadas en animales de 15 semanas de edad.



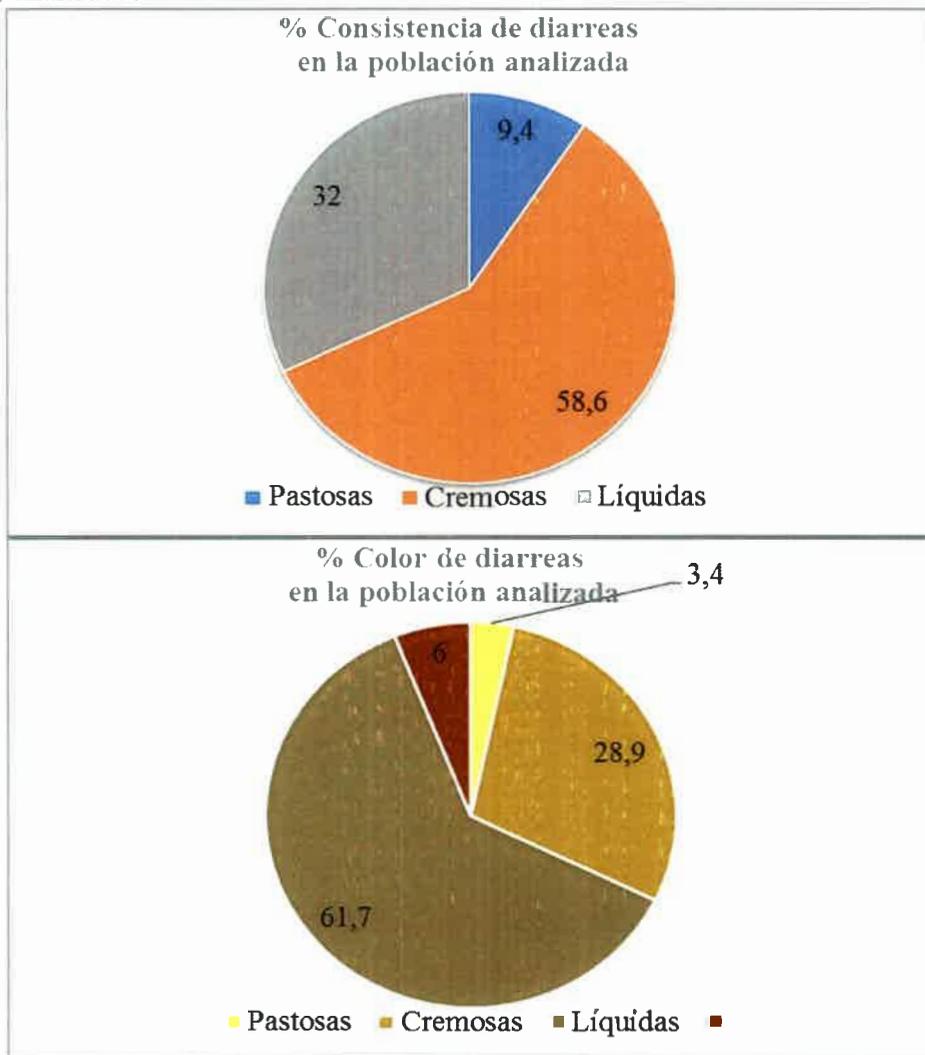
En los animales de 21 semanas de edad, la consistencia cremosa siguió presentándose en mayor proporción con un 67,2% (78/116), nuevamente seguida de la líquida con 29,3% (34/116). En cuanto a la presentación de colores la de mayor presentación en esta edad fue la gris verdosa con el 88,8% (103/116), seguida por la marrón 1,7% (2/116), amarillo verdoso 8,6% (10/116) y amarillo 0,8% (1/116) (Gráfico 6).

Gráfico 6. Porcentaje de consistencias y color de las diarreas inspeccionadas en animales de 21 semanas de edad.



Al analizar los resultados en forma global, es decir, la caracterización de las diarreas observadas independientemente de la edad de los animales se evidenció que la diarrea cremosa es la que se observó en un mayor porcentaje con un 58,6% (243/415), seguida por la líquida en un 32% (133/415) y la pastosa con un 9,4 % (39/415). En cuanto a la característica de color se encontró que la de mayor frecuencia de presentación en las 3 edades estudiadas es la gris verdosa con un 61,7% (256/415), seguida por la amarilla verdosa 28,9 % (120/415), marrón 6% (25/415) y amarilla 3,4% (14/415) (Gráfico 7).

Gráfico 7. Porcentaje de consistencias y color de las diarreas inspeccionadas en las 3 edades analizadas.



6. RELACIÓN ENTRE LA PERCEPCIÓN E INSPECCIÓN DE LA DIARREA CON SU CARACTERIZACIÓN

Con el fin de relacionar la proporción de establecimientos con diarreas **percibidas** y/o **inspeccionadas** con las características de las mismas, se analizaron dichos resultados a las 8, 15 y 21 semanas de edad tal y como se referencia en el punto 4 en donde se detallan percepción e inspección de diarreas en los establecimientos.

Por otra parte, sobre el total de diarreas de cada tipo que fueron percibidas, se calculó la proporción según fueran **percepción negativa-inspección positiva** o **percepción positiva-inspección positiva**.

En el caso en que la diarrea fue **percibida** y la **inspección** fue **positiva**, las diarreas líquidas 97,2% (35/36) fueron las más frecuentes seguidas por las de consistencia cremosa 58,3% (42/72) y la pastosa en un 28,5% (8/28).

En cuanto a la característica de color de las diarreas las amarillas en un 100% son las que en mayor proporción se dieron cuando la diarrea **no** fue **percibida** por el productor y fueron **inspeccionadas**, seguida por las diarreas de color marrón 73,9% (17/23), gris verdoso 46,6% (21/45) y amarillo verdoso 11,3% (7/62).

En aquellos casos en que la diarrea fue **percibida** e **inspeccionada** las diarreas amarillas verdosas son las que en mayor proporción se presentaron 88,7% (55/62), seguida por las de color gris verdoso 53,3% (24/45) y marrón 26,0% (6/23). Las diarreas de color amarillo no se presentaron (0 %- 0/6) (Tabla 9).

Tabla 9. Características de color y consistencia de las diarreas *versus* la percepción del productor a la presencia de diarreas y su observación durante la inspección en los animales de 8 semanas de edad.

PERCEPCIÓN/ INSPECCIÓN	CONSISTENCIA						COLOR							
	Pastosa		Cremosa		Líquida		Amarillo		Amarillo Verdoso		Gris Verdoso		Marrón	
	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%
Percepción (-) Inspección (+) (Proporción**=12/17)	20/28	71,4	30/72	41,6	1/36	2,7	6/6	100	7/62	11,3	21/45	46,6	17/23	73,9
Percepción (+) Inspección (+) (Proporción**=5/17)	8/28	28,5	42/72	58,3	35/36	97,2	0/6	0	55/62	88,7	24/45	53,3	6/23	26,0

Prop. * = Se refiere a la cantidad de diarreas con determinado tipo de consistencia o color con **percepción negativas - inspección positiva** o **percepción positiva – inspección positiva** sobre el total de diarreas que se presenta por cada característica de consistencia o color con **inspección positiva**

Proporción **= Cantidad de granjas con **percepción negativas** o **percepción positiva** sobre la **inspección positiva**

Para los animales de 15 semanas se encontró que de 20 establecimientos en donde se realizaron hallazgos de diarrea en la **inspección** en 12 granjas **no** fueron **percibidas** por el productor y en 8 **si** lo fueron.

En los animales de 15 semanas de edad se observó en aquellos establecimientos en donde la diarrea **no** fue **percibida** y si fue **inspeccionada**, mostrando que las diarreas pastosas con un 57,1% (4/7) son las que en mayor proporción se presentaron, seguida por las diarreas de consistencia líquida 51,9% (40/77) y la cremosa 39,8% (37/93).

La proporción de aquellos casos en que el productor **percibió** la diarrea y las mismas fueron **inspeccionadas** las diarreas de consistencia cremosa con un 60,2% (56/93) fueron las más observadas, seguida por las diarreas líquidas 48% (37/77) y pastosas 42,8% (3/7).

En cuanto al color, las diarreas grises verdosas en un 63% (68/108) son las que en mayor proporción el productor **percibe** y durante la **inspección** fueron observadas, seguida por las diarreas de color amarillo verdoso 51,9% (27/52), amarillas 5,8% (1/17). No hubo en este caso diarreas de color marrón (0/0).

Las diarreas amarillas en un 94,1% (16/17) son las que en mayor proporción el productor **no percibe** y la **inspección** fue **positiva**, seguida por las diarreas de color amarillo verdoso 48% (25/52) y gris verdoso 37% (40/108). La diarrea de color marrón no se presentaron (0% - 0/0) (Tabla 10).

Tabla 10. Características de color y consistencia de las diarreas *versus* la percepción del productor a la presencia de diarreas y su observación durante la inspección en los animales de 15 semanas de edad.

PERCEPCIÓN/ INSPECCIÓN	CONSISTENCIA						COLOR							
	Pastosa		Cremosa		Líquida		Amarillo		Amarillo Verdoso		Gris Verdoso		Marrón	
	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%
Percepción (-) Inspección (+) (Proporción**=12/20)	4/7	57,1	37/93	39,8	40/77	51,9	16/17	94,1	25/52	48	40/108	37	0/0	0
Percepción (+) Inspección (+) (Proporción**=8/20)	3/7	42,8	56/93	60,2	37/77	48	1/17	5,8	27/52	51,9	68/108	63	0/0	0

Prop. * = Se refiere a la cantidad de diarreas con determinado tipo de consistencia o color con **percepción negativas - inspección positiva** o **percepción positiva – inspección positiva** sobre el total de diarreas que se presenta por cada característica de consistencia o color con **inspección positiva**

Proporción **= Cantidad de granjas con **percepción negativas o percepción positiva** sobre la **inspección positiva**

Por último, en 15 establecimientos en donde se realizaron hallazgos de diarrea en la **inspección** en 10 granjas **no** fueron **percibidas** por el productor y en 5 **si** lo fueron a las 21 semanas.

Por otra parte, en cerdos a las 21 semanas de edad en aquellos casos en que la diarrea **no** fue **percibida**, sin embargo fue **inspeccionada**, las diarreas pastosas con un 100% (4/4) fueron las que en mayor proporción se presentaron, seguida por las diarreas de consistencia líquida 61,8% (21/34) y la cremosa 57,7% (45/78).

En donde el productor **percibe** la diarrea y luego fue **inspeccionada**, se encontró que las diarreas de consistencia cremosa 42,3% (33/78) son las que más se **presentan**, seguidas por las líquidas 38,2 % (13/34) y donde las diarreas pastosas no se presentaron (0% - 0/4).

En cuanto a la característica de color de las diarreas las amarillas verdosa en un 100% (10/10) son las que en mayor proporción el productor **no percibe** en sus animales y fueron **inspeccionadas**, seguida por las diarreas de color gris verdosa 57,3% (59/103), marrón 50% (1/2) y finalmente las amarillas las cuales no fueron detectadas (0% - 0/1).

Las diarreas de color amarillo en un 100 % (1/1) son las que en mayor proporción el productor **percibe** y fueron **inspeccionadas**, seguida por las diarreas de color marrón 50% (1/2), gris verdoso 42,7% (44/103) y finalmente las amarillas verdosas las cuales no fueron detectadas (0% - 0/10) (Tabla 11).

Tabla 11. Características de color y consistencia de las diarreas *versus*. la percepción del productor a la presencia de diarreas y su observación durante la inspección en los animales de 21 semanas de edad.

PERCEPCIÓN/ INSPECCIÓN	CONSISTENCIA						COLOR							
	Pastosa		Cremosa		Líquida		Amarillo		Amarillo Verdoso		Gris Verdoso		Marrón	
	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%	Prop.*	%
Percepción (-) Inspección (+) (Proporción**=10/15)	4/4	100	45/78	57,7	21/34	61,8	0/1	0	10/10	100	59/103	57,3	1/2	50
Percepción (+) Inspección (+) (Proporción**=5/15)	0/4	0	33/78	42,3	13/34	38,2	1/1	100	0/10	0	44/103	42,7	1/2	50

Prop. * = Se refiere a la cantidad de diarreas con determinado tipo de consistencia o color con **percepción negativas - inspección positiva** o **percepción positiva – inspección positiva** sobre el total de diarreas que se presenta por cada característica de consistencia o color con **inspección positiva**

Proporción ** = Cantidad de granjas con **percepción negativas o percepción positiva** sobre la **inspección positiva**

7. RELACIÓN ENTRE LA PERCEPCIÓN E INSPECCIÓN DE DIARREAS Y LOS RESULTADOS ANIMALES NECROPSIADOS PCR POSITIVOS A *L. intracellularis*

Con el fin de establecer una posible relación entre la percepción e inspección de las diarreas y los resultados de PCR, se calculó, solamente considerando aquellos establecimientos que fueron PCR positivos a *L. intracellularis* (con al menos una reacción positiva en cualquiera de las edades) la proporción de diarreas **percibidas** (positivas o negativas) según la **inspección** fuera **positiva** o **negativa** (Tabla 12).

En el muestreo de las 8 semanas de edad, el 66,6% (2/3) tuvo **percepción negativa** pero a la **inspección** resultó **positiva** y el 0% (0/3) evidenció **percepción e inspección positiva**. En el 33,3% (1/3) de las granjas, tanto la **percepción** como la **inspección** fueron **negativas**, sin embargo fueron PCR positivos. Independientemente de la inspección, en el 100% (2/3+1/3) de los establecimientos tuvieron una **percepción negativa**.

A las 15 semanas, en el 33,3 % (2/6) de los establecimientos la **percepción** y la **inspección** fueron **positivas**. No hubo establecimientos con **percepción positiva e inspección negativa** (0/6). En el 33,3% (2/6) de los establecimientos la **percepción** fue **negativa** y la **inspección positiva** y en el 33,3% (2/6) de los casos, ambas (**percepción e inspección**) fueron **negativas**. Independientemente de la inspección, según la tabla 12 el 66,6% (2/6 + 2/6) de los establecimientos tuvieron una **percepción negativa**

Por último, en el muestreo de las 21 semanas, en el 30% (3/10) de los establecimientos tuvieron **percepción e inspección positiva**. En el 10% (1/10) de los casos, la **percepción** fue **positiva** y la **inspección negativa**. En el 40% (4/10) de los establecimientos tuvieron **percepción negativa e inspección positiva** y en el 20% (2/10) de los establecimientos ambas (**percepción e inspección**) fueron **negativas**

(Tabla 12). Independientemente de la inspección, en el 60% (4/10 + 2/10) de las granjas la percepción fue **negativa**, de acuerdo con la tabla 12.

Tabla 12. Concordancia entre la percepción de las diarreas por el productor y los hallazgos durante la inspección en granjas con resultado positivo a la técnica de PCR a *L. intracellularis* considerando la edad de los animales.

PERCEPCIÓN/INSPECCIÓN	EDAD (SEMANAS)		
	8 semanas	15 semanas	21 semanas
Percepción + / Inspección +	0/3 (0%)	2/6 (33,3%)	3/10 (30%)
Percepción + / Inspección -	0/3 (0%)	0/6 (0%)	1/10 (10%)
Percepción - / Inspección +	2/3 (66,6%)	2/6 (33,3%)	4/10 (40%)
Percepción - / Inspección -	1/3 (33,3%)	2/6 (33,3%)	2/10 (20%)

8. RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE LESIONES MACROSCÓPICAS Y LOS RESULTADOS DE ANIMALES NECROPSIADOS PCR POSITIVOS A *L. intracellularis*

De las lesiones en íleon como en VIC halladas en los animales necropsiados en cada una de las granjas, se analizó la relación entre la presencia de lesiones macroscópicas y el resultado de la técnica de PCR a los contenidos de íleon, colon y mucosa de íleon. En la foto 9 se evidencian algunos de los hallazgos obtenidos.

Los resultados obtenidos en cuanto a la presencia de **lesiones macroscópicas** con respecto al resultado de la prueba de PCR realizado al **contenido de íleon** evidenciaron que el 13% (6/46) de los animales que presentaron lesión fueron positivos a la prueba de PCR y el 86,9% (40/46) que presentaron lesiones macroscópicas no fueron positivos al PCR de contenido de íleon. Resultando todos los animales sin lesión negativos a la prueba (0/13). Estos resultados son mostrados en la tabla 13.

Tabla 13. Concordancia entre los resultados de la técnica de PCR en contenido de íleon *versus* la presentación de lesiones macroscópicas en íleon.

Presencia de Lesión Macroscópica en Íleon	Resultado a la Técnica de PCR en Contenido de Íleon		TOTAL
	Positiva	Negativa	
Positiva	6	40	46
Negativa	0	13	13
Total	6	53	59

Con respecto a la presencia de **lesión macroscópica** y el resultado de la técnica de PCR en **raspado de mucosa de íleon** se encontró que el 23,9% (11/46) de los animales que presentaron lesión obtuvieron resultado positivo a la técnica de PCR *versus* el 23% (3/13) de los animales que no presentaron lesión y obtuvieron resultado positivo y 76% (35/46) resultaron negativos a la prueba de PCR a pesar de que los animales presentaron lesión y por otra parte el 76,9% (10/13) presentaron resultados negativos al PCR y de igual forma no presentaron lesiones macroscópicas (Tabla 14).

Tabla 14. Concordancia entre los resultados obtenidos por medio de la técnica de PCR en raspado de mucosa de íleon *versus* la presentación de lesiones macroscópicas en íleon.

Presencia de Lesión Macroscópica en Íleon	Resultado a la Técnica de PCR en Raspado de Mucosa de Íleon		TOTAL
	Positiva	Negativa	
Positiva	11	35	46
Negativa	3	10	13
Total	14	45	59

Finalmente se muestra la proporción entre los animales que presentan lesión macroscópica en VIC y fueron positivos a la prueba de PCR en contenido fecal de colon que fue del 29,4% (10/34). La proporción de animales que no presentaron lesión pero fueron positivos a la prueba 16% (4/25). La proporción de animales que presentaron

lesión pero no fueron positivos a la técnica de PCR fue del 70,5% con respecto a los que no presentaron lesión macroscópica y fueron negativos a la prueba de PCR que fue del 84% (Tabla 15).

Tabla 15. Concordancia entre el resultado de la técnica de PCR en contenido de colon versus la presentación de lesiones macroscópicas en VIC.

Presencia de Lesión Macroscópica en VIC	Resultado a la Técnica de PCR De Contenido en Colon		TOTAL
	Positiva	Negativa	
Positiva	10	24	34
Negativa	4	21	25
Total	14	45	59

La tabla 16, muestra la relación entre los resultados obtenido por medio de la técnica de PCR para *L. intracellularis* realizada tanto a contenido de íleon, colon y raspado de mucosa ileal y la presencia de lesiones macroscópicas, evidenciando una elevada sensibilidad relativa donde para la relación de lesiones macroscópicas con el resultado a la prueba de PCR para **contenido de íleon** fue del 100% (6/6), **raspado de mucosa de íleon** del 78,5% (11/14) y 71,4% (10/14) para **contenido de colon**.

Con respecto a la especificidad relativa analizada se encontró que para la relación entre la presentación de lesiones macroscópicas y el resultado a la técnica de PCR en **contenido de íleon** fue del 24,5% (13/53), **raspado de mucosa de íleon** del 22,2% (10/45) y 46,6% (21/45) para **contenido de colon**. En cuanto a los valores predictivos positivos se evidenció para las relaciones de lesiones macroscópicas y los resultados de PCR para **contenido de íleon** fue del 13% (6/46), **raspado de mucosa de íleon** del 23,9% (11/46) y 29,4% (10/34) para **contenido de colon**.

Finalmente, los valores predictivos negativos para las relaciones de lesiones macroscópicas y los resultados de PCR para **contenido de íleon** fue del 13% (13/13),

raspado de mucosa de íleon del 76,9% (10/13) y 84% (10/34) para **contenido de colon**.

Foto 9. Lesiones macroscópicas de íleon observadas durante la necropsia de cerdos. A) Presencia de hiperemia, B) Mucosa de íleon con apariencia cerebroide y engrosamiento C) Superficie de la mucosa con presencia de moco y D) contenido de la luz intestinal del íleon con materia fecal de color marrón.

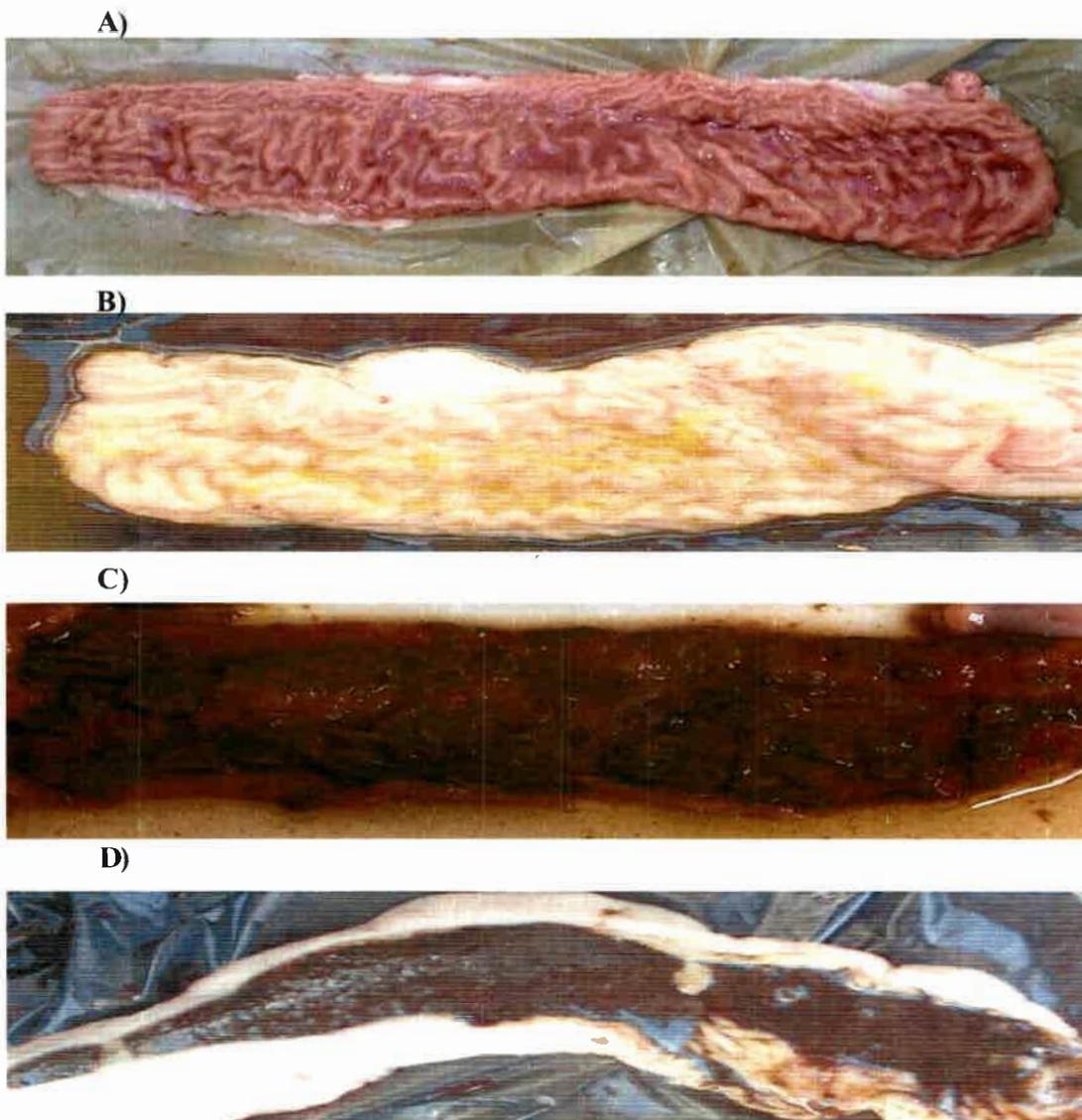


Tabla 16. Relación sensibilidad relativa – especificidad relativa – valores predictivos positivos y negativos de la relación entre los resultados obtenidos por la técnica de PCR de las muestras de contenido de íleon, raspado de mucosa de íleon y contenido colon versus la presencia de lesiones macroscópicas en íleon y VIC.

	SENSIBILIDAD RELATIVA		ESPECIFICIDAD RELATIVA		VALOR PREDICTIVO (+)		VALOR PREDICTIVO (-)	
	proporción	%	proporción	%	proporción	%	proporción	%
Relación lesión íleon - PCR contenido íleon*	6/6	100,0	13/53	24,5	6/46	13,0	13/13	100,0
Relación lesión íleon - PCR mucosa íleon**	11/14	78,5	10/45	22,2	11/46	23,9	10/13	76,9
Relación lesión VIC - PCR contenido colon***	10/14	71,4	21/54	46,6	10/34	29,4	21/25	84,0

* Se refiere a los resultados de la tabla 13, resultado obtenido por medio de la técnica de PCR de muestras de contenido de íleon *versus* la presencia de lesiones macroscópicas en íleon.

** Se refiere a los resultados de la tabla 14, resultado obtenido por medio de la técnica de PCR de muestras de raspado de mucosa de íleon *versus* la presencia de lesiones macroscópicas en íleon.

*** Se refiere a los resultados de la tabla 15, resultado obtenido por medio de la técnica de PCR de muestras de contenido de colon *versus* la presencia de lesiones macroscópicas en VIC.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

1. PERFIL Y PRESENCIA DE *L. intracellularis*

La presencia de *L. intracellularis* en el 90,9% IC 95% (70-98,8) de las pjaras fue demostrada en el presente trabajo por la técnica de ELISA, lo que indica la alta prevalencia del microorganismo en Argentina. En todas las provincias que fueron muestreadas, se encontraron establecimientos con serología positiva a *L. intracellularis*, destacando que en Córdoba, Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, La Pampa, San Juan y Tucumán se encuentran más del 80% del total de madres existentes en la Argentina, indicando una amplia distribución. En este sentido, la característica enzoótica de la EPP, ha sido señalada desde hace tiempo por varios autores (Mc Orist y Gebhart, 1999; Lawson y Gebhart, 2000; Hardge y col., 2005).

Diferentes estudios realizados en distintos países han mostrado prevalencias de *L. intracellularis* similares a las obtenidas en este estudio. Más específicamente se han informado prevalencias utilizando la técnica de PCR del 94% en Alemania (Wendt y Schulze, 2004), 93% en Canadá (Paradis y col., 2007); 93% en República Checa – Hungría y Polonia (Biksi y col., 2006), 93,7% Dinamarca (Stege y col., 2000). Finalmente en Corea se determinó una prevalencia del 100% de las granjas muestreadas, utilizando la técnica de IFA (Lee y col., 2001).

La prevalencia serológica media intra predial registrada en el presente trabajo, sin tener en cuenta la edad de los animales fue 14,7 % con un IC 95% (10,54 – 18,84), valores alejados de los encontrados por Perfumo y col., (2006) donde observaron una prevalencia entre el 57% y el 90%, en cerdos de 90 a 100 días de edad. Estudios anteriores realizados en Argentina (Machuca y col., 2005) reportan un 20,1% (107/531) de sueros positivos, y una prevalencia intra predial entre el 3,6% y 65,1% y una media de 31,8% de 21 establecimientos muestreados en 5 provincias del país, y un 66,6%

(14/21) de granjas positivas por la técnica de IFA y en el año 2009, Machuca y col., encontraron un porcentaje de sueros positivos del 31,2% (281/900), una prevalencia intra predial en un rango del 7,1% a 80%, por IFA y un porcentaje de granjas positivas del 76,7% (23/30), resultados que al relacionarlos con la prevalencia obtenida en el presente trabajo, evidencian la continua circulación de *L. intracellularis* en las granjas argentinas, persistiendo la exposición de los animales, dada la epidemiología de la enfermedad.

La variabilidad observada entre los valores de prevalencia podría deberse a cambios en la diseminación y comportamiento de la enfermedad por el paso del tiempo entre las poblaciones muestreadas año tras año (Lee y col, 2001), así como el uso de diferentes técnicas diagnósticas empleadas, puesto que las propiedades de dichas pruebas pueden variar entre países, laboratorios, poblaciones de animales (Jacobson y col. 2011), y número de animales muestreados.

Si tenemos en cuenta los grupos etarios, en los animales de 21 semanas de edad se registró una frecuencia de animales positivos que varió entre un 30% y un 90% por granja (Gráfico 1). Esto demostraría que los anticuerpos están siendo detectados con mayor precisión alrededor de las 21 semanas de edad, coincidiendo con lo planteado por Jacobson y col. (2003), Stege y col. (2004) y Guedes (2006) quienes señalan que la respuesta inmune a la presencia de *L. intracellularis* se da principalmente en animales de 19 a 22 semanas de edad.

Sin embargo, en este estudio se comenzó a detectar anticuerpos a partir de las 8 semanas, indicando una probable infección a muy temprana edad (Gráfico 1). Pero de los siete establecimientos positivos a las 8 semanas de edad, tres resultaron negativos en los posteriores muestreo serológicos, lo que podría estar marcando resultados falsos positivos o inmunidad pasiva (Carvajal y col., 2006). Esto es coincidente con Burch (2000) que plantea que la EPP en sus formas crónicas y subclínicas se presentarían en animales de 6 a 16 semanas. Sin embargo, uno de éstos establecimientos resultó

positivo por PCR a las 21 semanas de edad, coincidiendo con Ohlinger, (2005) quién plantea que *L. intracellularis* es excretada en las heces alrededor de 2-4 semanas antes de la seroconversión y que a partir de ese momento la frecuencia de eliminación de *L. intracellularis* disminuye de forma significativa y en el momento del sacrificio sólo se detectan animales positivos de forma aislada.

Por otro lado, Mauch y Bielkei (2005a), estudiando establecimientos problemas encontraron serología positiva desde las 5 hasta las 26 semanas de edad, en coincidencia con Just y col, (2001), pero señalan que la seroconversión se presentó entre las 12 a 16 semanas a diferencia de lo hallado en el presente estudio. Sin embargo, podríamos decir que la detección de al menos un seropositivo en esta etapa, sumado a la fuerte seroconversión que se demostró a las 15 semanas de edad indicaría que el agente puede impactar tanto a una edad temprana cercana a las 8, como a las 15 semanas siendo esta última la más frecuente y por ello el mayor porcentaje de positivos a ELISA a las 21 semanas de edad.

En cuanto a la prevalencia intrapredial por PCR, en este estudio se encontró una media de 8,63% y un IC 95% (3,1-14,12) coincidiendo con trabajos previos (Ohlinger, 2005) realizados en Republica Checa – Hungría y Polonia (Biksi y col., 2006), Canadá (Paradis y col, 2007), Brasil (Moreno y col., 2002); Taiwan (Chang, y col., 1997) y Dinamarca (Stege y col., 2000) donde fueron encontradas prevalencias entre el 5% y el 58%.

Las muestras de materia fecal tomadas al azar permitieron identificar *L. intracellularis* en el 57% de los establecimientos, donde el porcentaje de animales positivos fue de 2,4%, 10% y 14,8% del total de muestreados para cada faja etaria (Tabla 3), indicando un incremento muy marcado entre el primer y el segundo muestreo, decayendo luego a las 21 semanas de edad (Gráfico 2) lo que está en consonancia con los resultados serológicos demostrando que *L. intracellularis* se presenta principalmente alrededor de las 15 semanas, si bien puede comenzar más

temprano y como señala Guedes, (2006), el agente puede eliminarse por 12 semanas después de comenzada la diarrea, explicando quizás nuestros hallazgos donde de los establecimientos positivos, más del 50% lo fueron en 2 muestreos y hallados en mayor proporción hacia el final, en el muestreo a las 21 semanas. Esto evidencia también un incremento de la diseminación fecal de *L. intracellularis* a partir de la semana 15, hallazgo congruente con lo obtenido por Armbruster *y col.*, (2004), quienes encontraron dicho incremento en animales de 15 y 18 semanas de edad, lo cual puede explicarse como una re exposición al microorganismo en los animales de desarrollo y terminación (Class *y Bilkei*, 2004).

El porcentaje de cerdos positivos a PCR fue bajo, y la proporción de establecimientos positivos a PCR fue menor a los de serología, lo que podría estar determinado por lo que señalan Jacobson *y col.*, (2003) sobre la baja sensibilidad de esta técnica, si bien se usó un Kit de extracción de ADN específico para materia fecal en donde los inhibidores de la reacción presente en este tipo de muestras son inhibidos.

Las diferencias entre los resultados obtenidos por la técnica de ELISA y PCR podrían derivarse de las diferencias de sensibilidad y especificidad de ambas pruebas independientemente del hecho de que la primera permite una detección indirecta del agente, mientras que la segunda lo hace de manera directa. Puesto que la sensibilidad para la prueba de serología puede variar entre el 72% y el 92,2% y la especificidad entre el 93% y 98% (Lee, 2006 *y Jacobson y col.*, 2011) y la técnica de PCR que puede variar entre el 39% a 72%, pero su especificidad es muy consistente alrededor de un 97% al 100% (Gebhart, 2004a). Lo cual se explica al tener en cuenta que la prueba de PCR se encuentra condicionada al tiempo de excreción de la bacteria en las heces, lo que hace que la prueba sea efectiva para comprobar la presencia del microorganismo en cerdos que padecen la enfermedad en forma clínica (Boesen *y col.*, 2004a) pero de acuerdo con Gebhart *y Guedes*, (2001) *y Gebhart*, (2004b), no es suficientemente sensible en aquellos animales que presentan cuadros subclínicos.

Dado los resultados del presente trabajo podríamos concluir que en nuestro país *L. intracellularis* se presenta en forma endémica como ya fuera señalado anteriormente.

2. PERCEPCIÓN E INSPECCIÓN DE DIARREAS

La variación en la evaluación clínica de las diarreas entre productores y profesionales veterinarios, referidas en el presente estudio como percepción e inspección respectivamente, ha sido reconocida y estudiada por Pedersen y Strunz, (2013). En su trabajo, estos autores analizaron por medio de imágenes fotográficas el grado de percepción de las diarreas que tenían tanto productores como profesionales observando cerdos entre las 6 y las 14 semanas de edad. Ellos demostraron que los productores son tan hábiles para identificar y clasificar de manera correcta las diarreas como los veterinarios.

Es posible que los productores presenten fallas en los procesos de observación de las manifestaciones clínicas de los cerdos en sus granjas o que, como Pedersen y Strunz, (2013) afirman, los productores que llevan trabajando más tiempo en la producción de cerdos sean los que presentan más fallas en el reconocimiento del signo, respecto de aquellos que recientemente están ingresando en este negocio, debido a que estos últimos pueden tener conceptos más claros y recientes para identificar las diarreas, a lo que podría sumarse el esfuerzo económico que un productor ejerce para establecer una producción porcina lo que redundaría en la vigilancia de todo evento y proceso que le pueda significar pérdidas o ganancias en sus animales.

El relativamente bajo porcentaje de establecimientos en los cuales la diarrea fue percibida por el productor puede deberse a que la diarrea es una manifestación clínica de baja frecuencia de presentación. Si bien la diarrea ha sido señalada como uno de los problemas más frecuentes en granjas porcinas comerciales de todo el mundo en animales de recría y terminación (Guedes, 2004; Burch, 2004) en el presente estudio solamente el 1,9% del total de animales inspeccionados presentaron diarrea con un

mínimo de 1,5% a las 21 semanas de edad y un máximo de 2,2% a las 8 y 15 semanas de edad (Tabla 7). Esto, de acuerdo con Jacobson (2003), denota una gran dificultad en el momento de interpretar la prevalencia de enfermedades diarreicas. En este sentido, Baadsgaard y Jørgensen, (2003) afirman que la cantidad de veces que dicha manifestación es detectada, es subvalorada, dificultando la diferenciación de los cerdos enfermos en comparación con los no enfermos. Concretamente entonces, el bajo porcentaje de diarreas observado, podría deberse a la baja frecuencia de presentación por la forma subclínicas o endémica de las enfermedades entéricas (Thompson, 2001; Jacobson, 2003), a la disposición de los alojamientos en donde los tipos de pisos afectan la observación de diarreas (Guedes, 2004) y a la implementación de terapias antibióticas que mitigan la enfermedad o el desequilibrio de la flora bacteriana típica del intestino (Jacobson *y col.*, 2003).

Factores humanos como una posible adaptación por parte del productor a la presentación de diarreas en sus animales, pueden conllevar a que éste asuma la diarrea como un evento normal o que no genera preocupación, como lo proponen Pedersen y Strunz, (2013), a lo que se suma el grado de relevancia que se da a la presentación de diarreas de acuerdo con la edad de los animales afectados (Jacobson *y col.*, 2003), puesto que dicha manifestación puede considerarse de presentación más común en animales jóvenes (Burch, 2004) a diferencia de los animales en etapa de desarrollo y terminación, en los cuales se generan pérdidas económicas por baja ganancia de peso, que pueden llegar a ser imperceptibles (Jacobson, 2003). Por lo tanto, es posible que se genere un proceso de subvaloración y sobrevaloración de las diarreas que, como lo explican Pedersen y Strunz, (2013), en una población con elevada prevalencia de diarrea, la sensibilidad de la inspección puede resultar en un gran número de animales con diarrea clasificados como falsos negativos, lo que puede resultar del acostumbramiento de la manifestación y a que no se realicen procesos de diagnóstico y tratamiento oportunos, y por otro lado en granjas con media o baja prevalencia de diarrea, la especificidad de la observación puede resultar en un gran número de cerdos no diarreicos, siendo clasificados como falsos positivos, lo cual puede redundar a la

implementación de tratamientos que en algunos casos pueden ser innecesarios o equívocos conllevando al detrimento de la producción.

De lo descrito en este punto podríamos señalar la necesidad de desarrollar protocolos específicos que permitan caracterizar la diarrea.

3. CARACTERIZACIÓN DE LA DIARREA

Pese a que el concepto de diarrea aparentemente es claro tanto para productores como para veterinarios (Pedersen y Strunz, 2013), en el presente estudio se encontró que en general la percepción de la diarrea por el productor en todas las edades fue menor a lo inspeccionado por los veterinarios. En este sentido, la diarrea fue percibida sólo entre el 28,6% y el 38,1% de los establecimientos analizados vs los porcentajes de establecimientos positivos a la inspección que variaron entre el 71,4% y el 90,5% de establecimientos (Gráfico 3). Las diarreas fueron caracterizadas teniendo en cuenta la consistencia y el color de la materia fecal. Independientemente de la edad, la diarrea que mayor frecuencia de presentación fue de consistencia cremosa y de color gris-verdoso (Gráfico 7). Al analizar las características según la edad de los animales, a las 8 semanas de edad la diarrea que más se presentó fue la cremosa de color amarillo-verdosa (Gráfico 4) y a las 15 y 21 semanas de edad lo fue la diarrea cremosa y gris-verdosa (Gráficos 5 y 6).

Si bien las características de las diarreas serán analizadas en relación a la percepción o inspección de la misma más adelante, el hecho de haber caracterizado las heces es un punto importante. Por un lado porque si bien existe cierta congruencia en la detección de diarrea entre observadores (Pedersen y col, 2011; Pedersen y Toft, 2011; Pedersen y Strunz, 2013) lo controvertido es definir cuando existe diarrea y cuando no ya que la consistencia y color normales de la materia fecal varían en cada una de las granjas y estarían asociadas a otros factores como la dieta, la edad de animales, el tamaño de la piara, la densidad de la población, factores de higiene y disposición e

iluminación de las instalaciones, pudiendo afectar no solo las características de las diarreas sino también la calidad de las observaciones clínicas (Baadsgaard y Enevoldsen, 1997) a lo que se suma la subjetividad de las características a evaluar (Pedersen y Tolf, 2011).

Por otro lado, la diarrea es una manifestación que indica un desequilibrio patológico en el animal y que como señala Guedes (2004) la evaluación clínica de los animales con diarrea y el aspecto macroscópico de las heces puede ayudar a enfocar un posible diagnóstico de los agentes implicados en el cuadro entérico, en el cual pueden estar interactuando uno o varios patógenos. Tradicionalmente se asocia la forma subclínica de la EPP con diarrea gris cemento y a la forma aguda de la EPP con una diarrea con sangre (Stevenson, 2001; Gebhart, 2004a; Burch, 2004; McOrist, 2005a y d; McOrist 2005b) aunque algunos animales pueden no presentar diarrea con esas características (Stevenson, 2001; Gebhart, 2004a; McOrist 2005b).

Del mismo modo, se asocia a patógenos que causan diarrea tal como *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y *Salmonella*, entre otras, con tipos diferentes de diarreas que orientarían al diagnóstico definitivo de la enfermedad (Thompson, 2001). Sin embargo existen escasos antecedentes en la literatura en donde se asocie taxativamente el color de las diarreas con un agente causal determinado. Esto genera cierta controversia ya que la mayor presentación de diarreas de tipo gris verdoso podría derivarse del tipo de alimento que consumen los animales o bien podría estar relacionada con la alta prevalencia de establecimientos ELISA positivos (IC 95%: 70-98,8) y PCR positivos (IC 95%: 36-78) a *L. intracellularis*.

Sin embargo no es posible afirmar que la presentación de diarreas esté directamente relacionada con la presencia del patógeno, puesto que como ya se mencionara, existen innumerables causas de diarreas (Jestin y col., 1985; Nabuurs y col., 1993; Johnstos y col., 2001; Guedes, 2004; Thompson, 2001 y 2006; Straw, Dewey y Wilson., 2000) a lo que se suma, la presencia de otras enfermedades infecciosas

frecuentes que pueden complicar la situación, jugando un rol importante en el desarrollo y severidad del signo clínico (Moller *y col.*, 1998; Thompson, Smith y Murray, 1998; Burch, 2004; McOrist y Gebhart, 2000) y que no fueron analizadas en el presente estudio.

Durante el presente trabajo se encontró que el 1,7% de los animales presentaron diarrea de color marrón a las 21 semanas de edad (Tabla 8, Gráfico 6) y podría pensarse entonces en diarreas con sangre. Esto es contrario a lo informado por Wilson *y col.* (1999) quienes evidenciaron que entre los signos clínicos de problemas digestivos en cerdos, la diarrea sanguinolenta fue encontrada en el 16% de los animales, aunque el número de animales que ellos analizaron fue mucho más bajo que el utilizado en el presente estudio.

En la siguiente sección se discutirá con más detalle la caracterización de las diarreas, con la percepción e inspección de la misma y la detección de *L. intracellularis* por PCR.

4. RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA DIARREA, PERCEPCIÓN E INSPECCIÓN Y PRESENCIA DE *L. intracellularis*.

Como se dijo anteriormente, la proporción de diarreas percibidas fue siempre menor a la proporción de diarreas inspeccionadas en una relación 1:3 aproximadamente (Gráfico 3).

Al analizar la relación existente entre la percepción y la inspección de diarreas entre las granjas teniendo en cuenta la edad de los cerdos, encontramos diferencias que vale la pena que sean analizadas. En el caso de los animales de 8 semanas, la percepción se dio solamente en el 28,6% de las granjas, pese a que durante la inspección la manifestación es detectada en el 81% de las granjas, demostrando de forma clara la subvaloración antes citada que se le da a la manifestación clínica

(Pedersen y Strunz, 2013), ya que en el 80% de las granjas la percepción fue negativa y la inspección positiva (Tabla 4). Algo similar ocurre en los muestreos de las 15 y 21 semanas de edad en donde en el 84,6% y el 71,4% de las granjas, respectivamente, la percepción fue negativa y la inspección positiva (Tablas 5 y 6).

En este sentido, la característica de la diarrea jugaría un rol importante, ya que cuando la manifestación clínica no fue percibida por el productor y si fue inspeccionada por el veterinario el mayor porcentaje de diarreas fue pastosa (71,4%; 57,1% y 100%) y de color amarillo o amarillo-verdoso (100%; 94,1% y 100%) en cerdos de 8, 15 y 21 semanas de edad respectivamente (Tablas 9, 10 y 11). Continuando en el análisis por edad cabe destacar, por otro lado, la concordancia que se observó entre la percepción de la diarrea por parte del productor y la inspección de la misma por parte del veterinario, es decir, cuando ambas fueron positivas. La proporción de granjas en las cuales se observó esta coincidencia fue del 83,3 % a las 8 semanas (Tabla 4), 100% a las 15 semanas (Tabla 5) y 71,4% a las 21 semanas de edad (Tabla 6). El 100 % de concordancia entre granjas con percepción e inspección de diarrea positiva, coincide con el hecho de que la mayor proporción de las diarreas en animales de 15 semanas de edad fueron cremosas y líquidas y de un color gris verdoso (Tabla 10). Algo similar ocurre en animales de 8 semanas de edad (en los cuales el porcentaje de coincidencia fue del 83,3%) en donde la mayor proporción de diarreas fueron líquidas y cremosas y amarillo y gris-verdoso (Tabla 9). A las 21 semanas, la mayor proporción de diarreas fueron pastosas y amarillo-verdosas y marrones (Tabla 11).

Todo esto puede interpretarse en que hubo una mayor coincidencia entre la percepción y la inspección cuando las características de las diarreas eran o bien más “impactantes” o más alejadas de lo que se considera una materia fecal normal, fundamentalmente en cuanto a la consistencia de la misma ya que el color mostró un comportamiento más errático. Probablemente, como fuera nombrado anteriormente, esto permita una mejor identificación de la diarrea por parte del productor, que hace que coincida en mayor medida con la inspección realizada por el veterinario.

Debe considerarse también que el hecho de que en los animales de mayor edad (21 semanas) el porcentaje de granjas en que la diarrea fue inspeccionada fuera el menor, podría darse debido a la importancia que recobran enfermedades con otro tipo de manifestaciones clínicas en esta etapa productiva del cerdo o que no se dé suficiente importancia a la presencia de diarreas en donde factores que generan estrés sean empleados como justificación a su presentación, como lo son los tipos de instalaciones, la movilización y manejo a los que son expuestos los animales los cuales efectivamente cuentan con el potencial de generar la manifestación clínica (Van Beers-Schreurs *y col.*, 1998; Chouet *y col.*, 2003), donde adicionalmente, se encuentra la presencia de agentes que aprovechan estas circunstancias para desafiar y generar problemas de salud en los cerdos (Jacobson *y col.*, 2003). Sin embargo, en el presente estudio la diarrea fue buscada en animales de esta edad por lo que es posible que la baja proporción de diarreas inspeccionadas se deba realmente a una baja frecuencia de presentación.

Si bien los factores causales de diarrea pueden originarse a partir de agentes infecciosos o no infecciosos (Jacobson, 2003) y la presencia del signo clínico no puede relacionarse directamente con la presencia de *L. intracellularis*, es importante advertir lo observado a las 15 semanas de edad en donde se daría un mayor impacto del microorganismo dentro de las pjaras, coincidiendo con Guedes (2006). El mayor impacto a esa edad, en el presente estudio, se infiere puesto que a las 15 semanas de edad se observó el máximo porcentaje de cerdos PCR positivos (sobre el total de establecimientos PCR positivos Gráfico 2) y la proporción de individuos PCR positivos aumentó sustancialmente respecto al muestreo anterior (8 semanas). Esto, sumado a la seroconversión que comienza a observarse a las 15 semanas de edad (Gráfico 1), a la característica de la diarrea en animales de esa misma edad (Tabla 10), a los máximos porcentajes de establecimientos positivos tanto a la percepción como a la inspección (Gráfico 3) y al máximo porcentaje de establecimientos PCR positivos cuando hubo coincidencia entre la percepción y la inspección (Tabla 12) nos permite hacer esa afirmación.

Sin embargo, en el presente estudio hubo establecimientos en donde la diarrea no fue percibida ni inspeccionada y la presencia de *L. intracellularis* fue demostrada por PCR en animales de 8, 15 y 21 semanas de edad (Tabla 12). En este sentido, la enfermedad puede presentarse sin signos clínicos (Knittel *y col.*, 1998) o estos pueden ser poco manifiestos como el retraso en el crecimiento que solo puede ser detectables en aquellas granjas donde llevan un control estricto de parámetros productivos como índice de conversión alimenticia y ganancia diaria de peso. En los casos más leves de EPP (subclínica), los signos clínicos que suelen presentarse son: la disminución de la ganancia media diaria de peso y el aumento del índice de conversión, esto ocasiona que los cerdos realmente afectados sean difíciles de reconocer, de igual forma, a la necropsia estos animales presentan lesiones leves en el intestino delgado (Guedes *y col.*, 2003) y esto fue observado en el presente estudio cuando se evaluaron las lesiones intestinales macroscópicas.

Considerando lo analizado respecto a la caracterización de diarreas y a su percepción e inspección, podríamos señalar la necesidad de desarrollar protocolos específicos para la caracterización del signo clínico que permitan disminuir la brecha existente entre la percepción por parte del productor e inspección por parte del veterinario.

5. RELACIÓN ENTRE LESIONES MACROSCÓPICAS Y PRESENCIA DE *L. intracellularis* POR PCR

En cuanto a la presencia de lesiones macroscópicas evaluadas en los animales necropsiados, se evidenció que los animales que fueron positivos a la prueba de PCR a *L. intracellularis* presentaron lesiones. Sin embargo, no todos los que presentaron lesiones fueron positivos a la PCR (Tablas 13, 14 y 15). Lo anterior tiene congruencia con lo propuesto por Pedersen *y col.*, (2012) quienes encontraron una correlación positiva entre la severidad de la enfermedad, los hallazgos patológicos y la detección cuantitativa de *L. intracellularis* en heces de cerdos con diarrea.

Independientemente del lugar específico de la lesión (íleon o VIC) y el origen de la muestra utilizada para PCR (contenido de íleon, raspado de íleon y contenido de colon) la relación entre la presencia de lesiones macroscópicas y la técnica de PCR evidencia una elevada sensibilidad relativa (entre 71,4% y 100%), que por lo tanto se traduce en un alto valor predictivo negativo, generando la certeza de que el resultado negativo tanto a la presencia de lesión como a la PCR es un resultado verdaderamente negativo (Tabla 16) a pesar de que ha sido descrito que la lesión del tejido entérico se inicia microscópicamente y evoluciona lentamente hasta evidenciarse a nivel macroscópico (Smith y McOrist, 1997; Lawson y Gebhart 2000; McOrist y Gebhart, 2000; Gebhart, 2004a; Hardge y col., 2005).

Dicha sensibilidad relativa alta, es superior a la previamente informada por Gebhart (2004a) que ha sugerido que puede variar entre el 39% a 72% y traería aparejado el problema de una elevada cantidad de resultados falsos positivos lo cual sumado a la baja especificidad relativa encontrada (entre 22,2% y 46,6%) revela la capacidad baja que tiene la relación de test para detectar los animales sanos, siempre en relación con las lesiones intestinales ya que la especificidad de la técnica sin relación con las mismas es muy consistente alrededor de un 97% al 100% (Gebhart 2004a).

Las diferencias entre sensibilidad y especificidad relativas encontradas en el presente estudio con respecto a las previamente informadas, seguramente se deban a que en este trabajo se consideró como lesión al menos una alteración macroscópica que puede tener o no relación con la presencia de EPP.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. *L. intracellularis* está presente en forma endémica en el país y dentro de los establecimientos de la República Argentina. Siendo el presente trabajo el primero realizado en la Argentina con las técnicas de PCR y ELISA.
2. Su difusión se da principalmente entre las 8 y 15 semanas de edad y su mayor impacto alrededor de las 15 semanas.
3. La técnica de PCR permite detectar el agente durante su eliminación, mientras que la técnica de ELISA es útil cuando la enfermedad ya impactó en la población.
4. La utilización de PCR y ELISA conjuntamente permitió determinar la dinámica de la enfermedad lo que facilitaría el control y tratamiento para minimizar el impacto de la misma.
5. Es clara la diferencia entre la mayor proporción de diarreas inspeccionadas por el profesional veterinario con respecto a las percibidas por el productor.
6. Si bien las características de la diarrea pueden variar por numerosos factores, dado el contexto de este estudio es posible la relación de entre determinadas características y la presencia de *L. intracellularis*.
7. La sensibilidad relativa de la PCR respecto a las lesiones intestinales macroscópicas presenta un alto valor predictivo negativo, lo que sugiere su recomendación como prueba tamiz.

8. La presencia de lesiones macroscópicas es un factor común que se repite en los animales positivos a la técnica de PCR, sin embargo no todos los animales PCR positivos presentan lesión macroscópica.



CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Armbruster, G.; B. Kremer; K. Keffaber; G. Pelger; C. Gebhart; J. Weatherford. 2004. *Lawsonia Intracellularis* prevalence study. Proceedings of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany. 1:443.

Baadsgaard N.P.; C. Enevoldsen. 1997. A potential approach to support animal welfare promotion in a Danish veterinary practice context. Proceedings of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine. Chester, April; p. 108–119.

Baadsgaard, N.P.; E. Jørgensen. 2003. A Bayesian approach to the accuracy of clinical observations. Preventive Veterinary Medicine. 59, 189-206.

Baccaro, M.R.; A.M. Moreno; L.T. Shinya; D. Sabatini Dotto. 2003. Identification of bacterial agents of enteric diseases by multiplex PCR in growing-finish pigs. Braz. J. Microbiol. 34: 225-229.

Bakker, J., H.M.J.F. van der Heijden; M. De Smet; J. Vos. 2000. Comparison on laboratory techniques for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy (PPE) en fattening pigs. The 16th Internacional Pig Veterinary Society Congress. Melbourne, Australia. September, p. 17-20.

Biester, H.E.; L.H. Schwarte. 1931. Intestinal adenoma in swine. Am. J. Pathol. 7: 175-185.

Biester, H.E.; L.H. Schwarte; D.F. Eveleth. 1939. Studies on a rapidly developing intestinal adenoma in a pig. Am. J. Pathol. 15: 385-389.

Bihl, T.P. 2003. Protein – losing enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in a weanling foal. Can. Vet. J. June, 44:65-66.

Biksi, I., B. Molnár, M. Lorincz, V. Szász, L. Szeifert, O. Szenci. 2006. *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira* species prevalence in fatteners in the Czech Republic, Hungary and Poland – large scale Hungarian unit with and without diarrhea. Proceedings of the 19th IPVS Congress. Copenhagen, Denmark. 2: 354.

Boesen, H.T.; T.K. Jensen; A.S. Schmidt; B.B. Jensen; S.M. Jensen; K. Møller. 2004a. The influence of diet on *Lawsonia intracellularis* colonization in pigs upon experimental challenge. Vet. Microbiol. 103:35-45.

Boesen, H.T.; T.K. Jense; K. Møller; G. Jungersen. 2004b. Evaluation of and enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) as a serologic test for *Lawsonia Intracellularis* the agent of porcine proliferative enteropathy. Proceedings of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany, p. 1:251.

Bundgaard, H. 2000. Attempt to eliminate *Lawsonia Intracellularis* in a new established high health sow herd. The 16th Internacional Pig Veterinary Society Congress. Melbourne, Australia. September, p. 69.

Burch, D. G. S. 2000. Controlling ileitis in the “Colitis” complex. The Pig J. General section, 45:131-149

Burch, D. G. S. 2004. Controlling diarrhoea in growing pigs – “the grey scour syndrome”. Disponible en: <http://www.octagon-services.co.uk/articles/diarrhoea.htm>.

Busse, F.W. 2004. Acute ileitis (PIA) in replacement gilts, a German case report. Proceedings of the 18th IPVS Congreso. Hamburg, Germany, p.1:282.

Carvajal, A.; J. Pozo; C. C. García; J.A. Collazos; P. Rubio. 2005. Enteropatia proliferativa suína. Suis Brasil. Noviembre, 8:34-40.

Carvajal, A., J. Collazos; K. García; J. Osorio; P. Rubio. Enteropatía Proliferativa Porcina. 2006. Av Tecnol. Porc. 3(5): 6-21.

Chang, W.L.; C.F. Wu; Y. Wu; Y.M. Kao; M.J. Pan. 1997. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in swine herds in Taiwan. Vet. Rec. July, 26 (141):103-104.

Chouet, S.; C. Prieto; L. Mieli; M.F. Veenhuizen; S. McOrist. 2003. Patterns of exposure to *Lawsonia intracellularis* infection on European pig farms. Vet. Rec. January, 4(152): 14-17.

Class, M.; Bilkei, G. 2004. Seroprevalence of antibodies against *Lawsonia intracellularis* among pigs raised indoor vs outdoor units. JAVMA. December, 225(12):1905-1907.

Collins, A.M.; I. Swift; R.P. Monckton. 1996. Replication of Australian porcine isolates of ileal symbiont *intracellularis* in tissue culture. Vet. Microbiol, 49:249-255.

Collins, A.M.; M. van Dijk; S. McOrist; R.J. Love. 2000a. Strategic medication and development of immunity to *Lawsonia Intracellularis*. The 16th Internacional Pig Veterinary Society Congress. Melbourne, Australia, September, p. 30.

Collins, A.; R.J. Love; J. Pozo; S.H. Smith; SD. McOrist. 2000b. Studies on the ex vivo survival of *Lawsonia intracellularis*. J. Swine Health Prod, 8(5):211-215.

Cooper, D.M.; D.L. Swanson; C.J. Gebhart. 1997. Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer and ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. Vet. Microbiol. 54:47-62.

Corzo, C.A.; R.M. Friendship; C.E. Dewey; T. Blackwell. 2005a. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in Ontario swine herds. *J. Swine Health Prod.* November and December, 13(6):314-317.

Corzo, C.A.; R.M. Friendship; C.E. Dewey; T. Blackwell. 2005b. Comparison of 2 serologic test for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Can. Vet. J.*, May, 46:433-435.

Dale, C.J.H.; E.K. Moses; C.C. Ong; C.J. Morrow; M.B. Reed; D. Hasse; R.A. Strugnell. 1998. Identification and sequencing of the *groE* operon and flanking genes of *Lawsonia intracellularis*: use in phylogeny. *Microbiol.* 144: 2073-2084.

Dauvillier, J.; V. Picandet; J. Harel; M. Gottschalk; R. Desrosiers; D. Jean; J.P. Lavoie. 2006. Diagnostic and epidemiological features of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in 2 foals. *Can. Vet. J.* July, 47:689-691.

Fox, J.G.; F.E. Dewhirst; G.J. Fraser; B.J. Paster; B. Shames; J.C. Murphy. 1994. Intracellular *Campylobacter* – like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *J. Clin. Microbiol.* May, 32(5):1229-1237.

Gebhart C.J.; S.M. Barns; S. McOrist; G.F. Lin; G.H. Lawson. 1993. Ileal symbiont *intracellularis*, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (3):533-538.

Gebhart, C. 1996. Antemortem diagnosis of proliferative enteritis. Allen D. Leman Swine Conference, p. 57-59.

Gebhart, C.; Guedes, R. 2001. Proliferative Enteropathy: diagnostics and immunity. *AASV.* 353 – 357.

Gebhart, C.J. 2004a. Aetiology of Proliferative Enteropathy (PE) – overview and research update. Research Update: 1st Novartis Animal Health European Swine Ileitis/Colitis Workshop. Alpbach, Australia, p. 5-10.

Gebhart, C.J. 2004b. Proliferative Enteropathy (PE) in pigs – diagnostics and immunity. Research Update: 1st Novartis Animal Health European Swine Ileitis/Colitis Workshop. Alpbach, Australia, p. 19-24.

Gebhart, C.J. 2006. Past, Present and future tests to diagnose subclinical ileitis. 2ND Boehringer Ingelheim IPVS Ileitis Symposium. Copenhagen, July 17TH, p. 1-7.

GITEP - Grupo de intercambio tecnológico de explotaciones porcinas. 2003. Anuario del sector porcino. Secretaria de agricultura, ganadería, pesca y alimentación. Argentina.

Guedes, R.M.C.; C.J. Gebhart; N.L. Winkelman; R.A. Mackie-Nuss. 2000. Comparative study of an indirect immunofluorescent test and the onmunoperoxidase monolayer assay for diagnosing porcine proliferative enteropathy. Proc 16th Intl. Pig vet. Soc. Congress. Melbourne, Australia. September, p. 61.

Guedes, R.M.C.; C.J. Gebhart; N.L. Winkelman; R.A. Mackie-Nuss; T.A. Marsteller. 2000. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. Proc 16th Intl. Pig Vet. Soc. Congress. Melbourne, Australia. September, p. 26.

Guedes, R.M.C.; C.J. Gebhart; N.L. Winkelman; R.A. Mackie-Nuss; T.A. Marsteller; J. Deen. 2002a. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. Can. J. Vet. Res. 66:99-107.

Guedes, R. M. C.; C. J. Gebhart; G. A. Armbruster; B. D. Roggow. 2002b. Serologic follow-up a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative hemorrhagic enteropathy. *Can. J. Vet. Res.* 66: 258-263.

Guedes, R.M.C.; N.L. Winkelman; C.J. Gebhart. 2003. Relationship between the severity of porcine proliferative enteropathy and the infectious dose of *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Rec.* October, 4(153):432-433.

Guedes, R.M.C.; C.J. Gebhart. 2003a. Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Microbiol.* 91:135-145.

Guedes, R.M.C.; C.J. Gebhart. 2003b. Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. *Vet. Microbiol.* 93:159-166.

Guedes, R.M.C.; C.J. Gebhart. 2004. Progression of *Lawsonia intracellularis* infection and mucosal immune response in pigs. Proceedings of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany, 1:250.

Guedes, R.M.C. 2004. Diarréias em suínos de recria e terminação – agentes infecciosos e o processo diagnóstico. *Rev. Suínos & Cia.* II (10):36-39.

Guedes, R.M.C. 2005. Enteropatia proliferativa suína. 1º Seminário Novartis Latino – Americano sobre Ileíte e Colite Suína. Foz do Iguacu. Brazil, Abril, p. 56-66.

Guedes, R. 2006. Pathogenesis of subclinical Ileitis. The inside story. 2ND Boehringer Ingelheim IPVS Ileitis Symposium. Copenhagen. Julio, 17:1-7.

Hardge, T.; S. McOrist; V. Ohlinger; M. Roof; P. Rubio; H. Voets, D. Walter. 2005. Enteropatia proliferativa porcina – Ileítis. Enterisol® Ileitis. Manual técnico. Boehringer Ingelheim, p. 7 – 30.

Herbst, W.; B. Hertrampf; T. Schitt; R. Weiss; G. Baljer. 2003. Diagnosis of *Lawsonia intracellularis* using the polymerase chain reaction (PCR) in pigs with and without diarrhea and other animal species. Dtsch Tierarztl Wochenschr. September, 110(9):361-364.

Holyoake, P.K.; R.S. Cutler; I.W. Caple; R.P. Monckton. 1994. Enzyme-Linked immunosorbent assay for measuring ileal symbiont intracellularis-specific immunoglobulin G response in sera of pigs. J. Clin. Microbiol. 32(8):1980-1985.

Holyoake, P.K.; G.F. Jones; P.R. Davies; D.L. Foss; M. Panaccio; D. Hasse; M. Murtaugh. 1995. Application of a polymerase chain reaction assay to diagnose proliferative enteritis in pig herds. In Manipulating Pig Production V. APSA, ed. P Cranwell, p.171.

Huerta, B.; A. Arenas; L. Carrasco; A. Maldonado; C. Tarradas; A. Carbonero; A. Perea. 2003. Comparison of diagnostic techniques for porcine proliferative enteropathy (*Lawsonia intracellularis*) infection. J. Comp. Path. 129:179-185.

Jacobson, M. 2003. Enteric diseases in pig from weaning to slaughter. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uphala, Swedish. Disponible en: <http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000353/01/Veterinaria158.pdf>

Jacobson, M.; C. Hård af Segerstad; A. Gunnarsson; C. Fellström; K. de Verdier Klingenderrg; P. Wallgren; M. Jensen – Waern. 2003. Diarrhoea in the growing pig – a comparison of clinical, morphological and microbial finding between animals from good and poor performance herds. Res. Vet. Sci. 74: 163-169.

Jacobson, M.; A. Aspan; M. Heldtander Königsson; C. Hård af Segerstad; P. Wallgren; C. Fellström; M. Jensen-Waern; A. Gunnarson. 2004. Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and pos mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. Vet. Microbiol. September, 102(3-4): 189-201.

Jacobson, M.; P. Wallgren; A. Nordengrahn; M. Merza; U. Emanuelso. 2011. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis* in pig sera. Acta Veterinaria Scandinavica.53:23.

Jestin, A.; M.R. Popoff; S. Mahé. 1985. Epizootiologic investigations of a diarrheic syndrome in fattening pigs. A.J.V.R. 46:2149-2151.

Joens, L.A.; S. Nibbelink; R.D. Glock. 1997. Introduction of gross and microscopic lesions of porcine proliferative enteritis by *Lawsonia intracellularis*. AJVR. October, 58(10):1125-1131.

Johnston, T.; C.E. Dewey; R.M. Friendship; N. Smart; B.J. McEwen; M. Stalker; C.F.M. de Large. 2001. An investigation of the etiology of a mild diarrhea observed in a group of grower/finisher pigs. Can Vet J. January, 42: 33 – 37.

Jones, G. F.; G.E. Ward; C.J. Gebhart; M.P. Murtaugh; J.E. Collins. 1993a. Use of a DNA probe to detect the intracellular organism of proliferative enteritis in the feces of swine. A.J.V.R. 54:1585-1590.

Jones G.F.; G.E. Ward; M.P. Murtaugh; G. Lin; C.J. Gebhart. 1993b. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont, in feces by polymerase chain reaction. J.Clin. Microbiol. 31(10):2611-2615.

Jones, G. F.; G.E. Ward; M.P. Murtaugh; R. Rose; C.J. Gebhart. 1993c. Relationship between Ileal symbiont intracellularis and porcine proliferative enteritis. *Infect. Immun.* 61:5237-5244.

Jordan, D.M.; J.P. Knitted; K.J. Schwartz; M.B. Roof; L.J. Hoffman. 2004. A *Lawsonia intracellularis* transmission study using a pure culture inoculated seeder – pig sentinel model. *Vet. Microb.* 104:83-90.

Just, S.D.; C.O. Thoen; B.J. Thacker; J.U. Thompson. 2001. Monitoring of *Lawsonia intracellularis* by indirect serum immunofluorescence assay in a commercial swine production system. *J. Swine Health Prod.* 9:57-61.

Keller, C.; V.F. Ohlinger; A. Nordengran; M. Merza. 2004a. A blocking Elisa for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis*. Proceedings of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany, 1:293.

Keller, C.; V.F. Ohlinger; A. Wilms-Schulze Kump; T. Grätz; H. Grunert; E. Sieverding; R. Heggemann; P. Hoßfeld. 2004b. Herds profiles of antibodies against *Lawsonia intracellularis* in German farms using a new blocking Elisa. Proceedings of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany, 1:253.

Kim, O.; B. Kim; C. Chae. 1998. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in selected pig herds in Korea as determined by PCR. *Vet. Rec.* November, 21 (143):587-589.

Klein, E.C.; C.J. Genhart; G.E. Duhamel. 1999. Fatal outbreak of proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colonyraised rhesus macaques. *J. Med. Primatol.* 28:11-18.

Knittel, J.P.; D.I. Larson; D.L. Harris; M.B. Roof; S. McOrist. 1996. United States isolates of *Lawsonia intracellularis* from porcine proliferative enteropathy resemble European isolates. Swine Health Prod. 4:119-122.

Knittel, J.P.; D.M. Jordan; K.J. Schwartz. 1998. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-exposed pigs. A.J.V.R. 50:722-726.

Koyama, T.; T. Hirai; S. Nagai. 2004. In vitro cultivation and partial characterization of *Lawsonia intracellularis* from a Japanese field case of porcine proliferative enteropathy. Proceedings of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany, 1:307.

Kroll, J.J.; M.A. Eichmeyer; M.L. Schaeffer; S. McOrist; D.L. Harris; M.B. Roof. 2005. Lipopolysaccharide – based enzyme – linked immunosorbent assay for experimental use in detection of antibodies to *Lawsonia intracellularis* un pigs. Clin. Diagn. Lab. Immunol. June, 12 (6):693-699.

La, T.; N.D. Phillips; J. D. Hampson. 2003. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. J. Clin. Microbiol. July, 41(7):3372-3375.

La, T; N.D. Phillips; J. D. Hampson. 2004. Evaluation of a multiplex- PCR for the detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. Proceeding of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany, 1:283.

Ladinig, A.; I. Sommerfeld y H. Weissenbock. 2009. Comparative evaluation of diagnostic methods for *Lawsonia intracellularis* infection in pig, with emphasis on cases lacking characteristic lesion. J. Comp. Path. 140, p. 140-148.

Lawson, G.H.K.; S. McOrist; S. Jasni; R.A. Mackie. 1993. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: Cultivation and maintenance in vitro. *J. Clin. Microbiol.* May, 31 (5):1136-1142.

Lawson, G.H.K.; C.J. Gebhart. 2000. Review: Proliferative Enteropathy. *J. Comp. Path.* 122: 77-100.

Lee S.W.; T.J. Kim.; S.Y. Park.; C.S. Song.; H.K. Chang.; J.K. Yeh.; H.I. Park; J.B. Lee. 2001. Prevalence of Porcine Proliferative Enteropathy and its Control with Tylosin in Korea. *J.Vet. Sci.* 2(3). 209-212.

Lee J.B. 2006. Comparison of Enterisol Ileitis-ELISA with conventional IFA for detection of antibodies specific to *Lawsonia intracellularis*. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark. Volume 2, p.187.

Löfstedt, M.; N. Holmgren; M. Jacobson; C. Fellström; N. Lundeheim. 2004. *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira* species in Swedish growers. Proceedings of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany, 1:289.

Machuca, M.; J. Riganti; C. Venturini; J. Díaz Puerta.; H. Sanguinetti; C. Perfumo. 2005. Estudio serológico de anticuerpos de *Lawsonia intracellularis* en cerdos de engorde en la República Argentina. Agrupación de Consultores de Tecnologías del Cerdo. Argentina.

Machuca, M.A.; J.A. Cappuccio, , P.E. Piñeyro; M.C. Venturini; M.A. Quiroga; C.J. Perfumo. 2009. Serological and histopathological survey of *Lawsonia intracellularis* infection in 30 argentinean swine herds. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology.* 2(1), 8-11.

Mauch, C. H. Y.; G., Bilkei. 2005a. Effect of sow parity on the transmission of *Lawsonia intracellularis* to piglets. *Vet. Rec.* 155:532.

Mauch, C. P.; G. Bilkei. 2005b. Reproductive performance of gilts following an outbreak of acute proliferative enteropathy due to *Lawsonia intracellularis*. *Vet. J.* 170:128-131.

McCluskey J.; J. Hannigan; J.D. Harris; B. Wren; D.G.E. Smith. 2002. LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* June, 70, (6):2899-2907.

McOrist, S.; G.H.K. Lawson. 1989. Proliferative enteropathies: *Campylobacter* species in the faeces of normal and contact pigs. *Vet. Rec.* 124:41.

McOrist S.J.; S. Jasni; R.A. Mackie; N. Macintyre; N. Neef; G.H.K. Lawson. 1993. Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of Ileal symbiont intracellularis. *Infect. Immun.* 61:4286-4292.

McOrist, S.; C.J. Gebhart; G.H.K. Lawson. 1994. Polymerase chain reaction for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.* 41:205-212.

McOrist S.; R.A. Mackie; G.H.K. Lawson. 1995. Antimicrobial susceptibility of Ileal Symbiont Intracellularis isolated from pigs with Proliferative Enteropathy. *J. Clin. Microbiol.* May, 33(5):1314-1317.

McOrist, S., C.J. Gebhart. Porcine Proliferative Enteropathy. In: Straw, B.E. y col., (ed).1999. *Diseases of Swine*, 8th ed. Iowa State University Press, p. 521-534.

McOrist, S. y C.J. Gebhart . 2000. Enteropatía proliferativa porcina. En: Straw B.E., S. D’Allaire, W.L. Mengeling, D.J. Taylor. Enfermedades del cerdo, 8ª edición. Ames, Iowa: Iowa State University Press, Tomo I. (32):351-360.

McOrist, S. 2004. Epidemiology of the acute (PHE) and chronic (ileitis, PIA) forms of PE. Research Update: 1st Novartis Animal Health European Swine Ileitis/Colitis Workshop. Alpbach, Australia, p. 13-15.

McOrist, S. 2005a. Epidemiology of ileitis. 1º Seminario Novartis Latino – Americano sobre Ileíte e Colite Suína. Foz do Iguacu. Brazil, Abril, p. 43-45.

McOrist, S. 2005b. Treatment and control of ileitis. 1º Seminario Novartis Latino – Americano sobre Ileíte e Colite Suína. Foz do Iguacu. Brazil, Abril p. 46-48.

McOrist. S. 2005c. Las enteropatias porcinas a revisión. Ileítis en cerdos - ¿Que sabemos hoy? Parte I. University Collage of Veterinary Medicine. North Grafton, USA. Disponible en: www.calier.es/pdf/ileitis_es%20_cerdo_Partell.pdf.

McOrist. S. 2005d. Prevalence and Impact of Proliferative Enteropathy = Ileitis, in East Asia. Proceedings of the 2nd Asian Pig Veterinary Society Congress. September 19-21. EDSA Shangri-La, Pasig City. Philippines, p. 25-36.

McOrist S.; C.J. Gebhart; B.T. Bosworth. 2006. Evaluation of porcine ileum models of enterocyte infection by *Lawsonia intracellularis*. Can J. Vet. Res. 70:155-159.

Michalski, C.W.; F.F. Di Cola; K. Kümmel; M. Wendt; J.S. Königer; T. Giese; N. A. Giese; H. Friess. 2006. Human inflammatory bowel disease does not associate with *Lawsonia intracellularis* infection. BMC Microbiol. 6:81. Disponible en: www.biomedcentral.com/1471-2180/6/81.

Moller, K.; T.K. Jensen; S.E. Jorsal; T.D. Láser; B. Carstensen. 1998. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly haemolytic intestinal spirochaetes, salmonella enterica y haemolytic escherichia coli from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Vet. Microbiol.* 62:59-72.

Moore G.M., T.R. Shryock. 1996. *Lawsonia intracellularis* e l'enteropatia del suino. *Large Anim. Rev.* 2(2):45-50.

Moreno, A.M.; M.R. Baccaro; L.L. Coutinho. 2002. *Lawsonia intracellularis* detection in swine feces from important producing regions in Brazil. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 69 (3):5-8.

Nabuurs, M.J.A.; F.G. Van Zijderveld; P.W. De Leeuw. 1993. Clinical and microbiological field studies in the Netherlands of diarrhoea in pigs at weaning. *Res. Vet. Sci.* 55:70-77.

Nascimento, A.E.C.; W.V. Guimarães; M.C.D. Vanetti; E.F. Araújo. 1999. Detection of *Lawsonia intracellularis* in faeces of swine from the main producing regions in Brazil. *Can. J. Microbiol.* 45:230-234.

Ohlinger. V. 2005. *Ileitis: Diagnostico Porci*, p.59-68.

Paradis, M.A.; M. Gottschalk.; A. Rajic; A. Ravel; J.B. Wilson; J. Aramini; C.A. McClure; C.P. Dick. 2007. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in different swine populations in 3 provinces in Canada. *Can. Vet. J.* 48:57-62.

Pedersen K.S.; M. Stahl; R.M. Guede; Ø. Angen; J.P. Nielsen; T.K. Jensen. 2012. Association between faecal load of *Lawsonia intracellularis* and pathological findings of proliferative enteropathy in pigs with diarrhoea. *BMC Vet Res.* Oct 23; 8:198.

Pedersen, K. S.; P. Holyoake; H. Stege; J.P. Nielsen. 2011. Observations of variable inter-observer agreement for clinical evaluation of faecal consistency in grow-finishing pigs. *BMC Preventive Veterinary Medicine* 98: 284-287.

Pedersen, K. S. y A. M Strunz. 2013. Evaluation of farmers' diagnostic performance for detection of diarrhea in nursery pigs using digital pictures of faecal pools. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 55:72.

Pedersen, K. S. y N. Toft. 2011. Intra – and inter-observer agreement when using a descriptive classification scale for clinical assessment of faecal consistency in growing pigs. *BMC Preventive Veterinary Medicine*. 98:288-291.

Perfumo, C.J.; M. Machuca; J. Cappuccio; P. Piñeyro; A. Quiroga; G. Vigo. 2006. Situación actual de las enfermedades que afectan la producción porcina en la Argentina. Cuadros digestivos asociados a *Salmonella* spp. y *Lawsonia intracellularis*. Memorias: V Congreso de producción porcina del MERCOSUR, VIII Congreso nacional de producción porcina y XIV Jornadas de actualización porcina, 22 al 24 de Mayo. Córdoba, Argentina, 221-224.

Rincón., M.A.; J.D. Mogollón; M. Cepeda; P. Preciado; S. Ruiz; S. De La Rosa. 2002. Diagnóstico diferencial de las enfermedades del sistema digestivo en porcinos de crecimiento y finalización. Memorias: Seminario Internacional de Actualización en Salud y Producción Porcina. Bogotá, Colombia.

Rowland A.C. y P.G.M. Rowntree. 1972. A Haemorrhagic bowel syndrome associated with intestinal adenomatosis in the pig. *Vet. Rec.* 91:235-241.

Rowland, A. C. y G.H.K. Lawson. 1992. Porcine proliferative enteropathies.. In: Leman A. D., B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire, D. J. Taylor. In *Diseases of swine*. 7th edn. Ames, Iowa State University Press, p. 560-569.

Schauer, D.B.; S.N. McCathey; B.M. Daft; S.S. Jha; L.E. Tatterson; N.S. Taylor; J.G. Fox. 1998. Proliferative enterocolitis associated with dual infection with enteropathogenic *Escherichia coli* and *Lawsonia intracellularis* in rabbits. J. Clinic. Microbiol. June, 36 (6):1700-1703.

Smith S.H. y S. McOrist. 1997. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. Res.Vet. Sci.. 62:6-10.

Smith, S.G.E. y G.H.K. Lawson. 2001. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferativa enteropathy. Vet. Microbiol. 82:331-345.

Sobestiansky, J.; D. Barcellos; A.M. Moreno; A. Sobestiansky; E. Poleze. 2005. Suínos: Coleta e remessa de materiais para laboratorios para fins de diagnóstico. Goiânia, Brasil.13-69. p 121

Sobestiansky, J.; D. Barcellos; N. Moraes; L.F. O.S. Carvalho; S.J. de Oliveira; A.M. Moreno; P.M. Roche. 1999. Clínica e Patologia Suína. Goiânia, Brasil. p. 464.

Sobestiansky, J. y D. Silveira. 1997. Técnica de necropsia em suínos coleta e remessa de material para laboratorio. Goiânia, Brasil

Socci, E.G.; V.F. Diosdado; J. López; S.E. Carrera; D.C. Arriaga; G.A. Morilla. 2005. Determinación de la frecuencia de pjaras infectadas con *Lawsonia intracellularis* en México mediante la técnica de PCR. Téc. Pecu. Méx. 43(2):211-218.

Sorden, S.D. 2001. Basic pathophysiology of enteric disease. AASV. Proceedings 32nd Annual Meeting. February 26-27. Nashville, Tennessee, p. 345-347.

Stege H.; T. Jensen; K. Moller; K. Vestergaasd; P. Baekbo; S. Jorsal. 2004. Infection dynamics of *Lawsonia intracelullaris* in pig herds. Veterinary microbiology 104 197-206.

Stege, H.; T.K. Jensen; K. Møller; P. Bækbo; S.E. Jorsal. 2000. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev. Vet. Med.* 46: 279-292.

Stevenson. W.G. 2001. Differential diagnosis of diarrhea in grow – finish swine. *AASV.* 359-363

Stills, H.F. 1991. Isolation of an intracellular bacterium from hamsters (*Mesocricetus auratus*) with Proliferative Ileitis and reproduction of the disease with a pure culture. *Infect.Immun.* September, 49 (9):3227-3236.

Suh, D.K. y J.C. Song. 2005. Simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* y *Salmonella* spp. in swine intestinal specimens by multiplex polymerase chain reaction. *J. Vet. Scien.* 6(3):231-237.

Thompson, J.R. 2001. Etiología y control de las principales infecciones entéricas porcinas. *ANAPORC.* Abril, 21 (210):36-55.

Thompson, J.R., Smith, W.J., Murray, B.P. 1998. Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. *Vet. Rec.* 7:235-239.

Thomson, J.R. 2006. Diagnosis and control of colitis in grow – finish pigs. *Memorias: V Congreso de producción porcina del MERCOSUR.* Córdoba, Argentina, 199–209.

Thursfield, M. 1990. *Epidemiología Veterinaria*, 1er edición. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. 191-205.

Van Beers-Schreurs H. M. G.; M. J. A., Nabuurs; L. Vellenga; Th. Wensing; H.J. Breukink. 1998. Role of the large intestine in the pathogenesis of diarrhea in weaned pigs. *AJVR.* Vol. 59., N°6, June. 696-703.

Viotti A.M.; S.A. França; F.A. Vannucci; E.C.C. Cruz Jr; M.C. Costa; C.J. Gebhart; R.M.C. Guedes. 2013. Infection of sparrows (*Passer domesticus*) and different mice strains with *Lawsonia intracellularis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Vol.33., No.3. Rio de Janeiro. p. 372-378.

Wendt, M.; A. Bonitz; S. McOrist. 2000. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in German breeding herds. *Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong.* 16:27.

Wendt, M. y R. Schulze. 2004. Cross Sectional Study on *Lawsonia intracellularis* Infections in German Farrow to Finish Herds. *Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany*. Vol. 1, p. 267.

Wilson J.B.; G.E. Pauling; B.J. McEwen; N. Smart; P.S. Carman; C.P. Dick. 1999. A descriptive study of the frequency and characteristics of proliferative enteropathy in swine in Ontario by analyzing routine animal health surveillance data. *Can Vet J*. October, 40:713-717.

Wilson J.B.; S. Honour; G.E. Pauling; B. O'Connor; M. Benjamin; M.A. Paradis; C.P. Dick. 2002. Surveillance for porcine proliferative enteropathy in Alberta by using routine diagnostic laboratory data. *Can Vet J*; Agosto;43(8):604-6.

Wilson, T.M.; K. Chang; C.J. Gebhart; H.J. Kurtz; T.R. Drake; V. Lintner. 1986. Porcine proliferative enteritis: serological, microbiological and pathological studies from three field epizootics. *Can J Vet Res*. 50:217-220.

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

Anexo 1. Datos de cantidad de animales, diarreas detectadas, percepción del productor a la diarrea y caracterización de éstas, obtenidos en la ficha de campo de las 21 granjas muestreadas en animales de 8 semanas de edad.

GRANJA	TOTAL DE ANIMALES	Nº TOTAL DE DIARREAS	DIARREA %	PERCEPCIÓN DIARREA	INSPECCIÓN DE DIARREAS	PASTOSA	CREMOSA	LÍQUIDA	AMARILLO	AMARILLO VERDOSO	GRIS VERDOSO	MARRÓN
1	680	9	1,32	No	Si	9	0	0	0	0	9	0
2	675	1	0,15	No	Si	0	1	0	0	1	0	0
3	732	51	6,97	Si	Si	0	22	29	0	51	0	0
4	400	7	1,75	No	Si	2	5	0	3	0	4	0
5	110	14	12,73	Si	Si	0	8	6	0	0	14	0
6	593	10	1,69	Si	Si	7	3	0	0	0	10	0
7	241	1	0,41	No	Si	1	0	0	0	0	0	1
8	400	1	0,25	No	Si	1	0	0	0	0	1	0
9	450	14	3,11	No	Si	0	14	0	0	0	0	14
10	185	0	0	Si	No	0	0	0	0	0	0	0
11	90	6	6,67	Si	Si	0	6	0	0	0	0	6
12	129	3	2,33	No	Si	0	3	0	3	0	0	0
13	148	0	0	No	No	0	0	0	0	0	0	0
14	300	5	1,67	No	Si	5	0	0	0	5	0	0
15	87	0	0	No	No	0	0	0	0	0	0	0
16	119	2	1,68	No	Si	0	2	0	0	0	0	2
17	130	0	0	No	No	0	0	0	0	0	0	0
18	150	1	0,67	No	Si	0	0	1	0	1	0	0
19	227	5	2,2	No	Si	0	5	0	0	0	5	0
20	100	2	2	No	Si	2	0	0	0	0	2	0
21	45	4	8,89	Si	Si	1	3	0	0	4	0	0
22	31	16	51,61	Si	Si	0	0	16	0	16	0	0

Anexo 2. Datos de cantidad de animales, diarreas detectadas, percepción del productor a la diarrea y caracterización de éstas, obtenidos en la ficha de campo de las 21 granjas muestreadas en animales de 15 semanas de edad.

GRANJA	TOTAL DE ANIMALES	Nº TOTAL DE DIARREAS	DIARREA %	PERCEPCIÓN DIARREA	INSPECCIÓN DE DIARREAS	PASTOSA	CREMOSA	LÍQUIDA	AMARILLO	AMARILLO VERDOSO	GRIS VERDOSO	MARRÓN
1	800	0	0	No	No	0	0	0	0	0	0	0
2	700	1	0,14	No	Si	0	1	0	0	0	1	0
3	1400	16	1,14	Si	Si	0	10	6	0	0	16	0
4	400	3	0,75	No	Si	0	3	0	0	0	3	0
5	112	16	14,29	Si	Si	0	11	5	1	4	11	0
6	590	12	2,03	Si	Si	0	12	0	0	4	8	0
7	1000	4	0,4	No	Si	0	3	1	0	4	0	0
8	472	7	1,48	No	Si	3	4	0	0	0	7	0
9	420	9	2,14	No	Si	0	0	9	0	0	9	0
10	135	24	17,78	Si	Si	0	16	8	0	8	16	0
11	90	0	0	No	No	0	0	0	0	0	0	0
12	109	8	7,34	No	Si	0	2	6	0	0	8	0
13	120	6	5	No	Si	0	4	2	6	0	0	0
14	160	8	5	No	Si	0	8	0	0	8	0	0
15	108	16	14,81	No	Si	0	8	8	0	8	8	0
16	76	11	14,47	Si	Si	1	0	10	0	0	11	0
17	108	8	7,41	Si	Si	0	0	8	0	8	0	0
18	110	8	7,27	Si	Si	1	7	0	0	2	6	0
19	203	4	1,97	No	Si	0	4	0	0	0	4	0
20	128	1	0,78	No	Si	1	0	0	0	1	0	0
21	48	1	2,08	Si	Si	1	0	0	0	1	0	0
22	22	14	63,64	No	Si	0	0	14	10	4	0	0

Anexo 3. Datos de cantidad de animales, diarreas detectadas, percepción del productor a la diarrea y caracterización de éstas, obtenidos en la ficha de campo de las 21 granjas muestreadas en animales de 21 semanas de edad.

GRANJA	TOTAL DE ANIMALES	Nº TOTAL DE DIARREAS	DIARREA %	PERCEPCIÓN DIARREA	INSPECCIÓN DE DIARREAS	PASTOSA	CREMOSA	LÍQUIDA	AMARILLO	AMARILLO VERDOSO	GRIS VERDOSO	MARRÓN
1	1000	8	0,8	Si	Si	0	8	0	0	0	8	0
2	940	23	2,45	No	Si	0	16	7	0	1	21	1
3	1400	22	1,57	Si	Si	0	10	12	0	0	21	1
4	400	7	1,75	No	Si	3	4	0	0	0	7	0
5	67	2	2,99	Si	Si	0	1	1	0	0	2	0
6	590	5	0,85	Si	Si	0	5	0	1	0	4	0
7	1000	1	0,1	No	Si	1	0	0	0	0	1	0
8	450	10	2,22	No	Si	0	5	5	0	9	1	0
9	420	11	2,62	No	Si	0	11	0	0	0	11	0
10	140	9	6,43	Si	Si	0	9	0	0	0	9	0
11	40	0	0	No	No	0	0	0	0	0	0	0
12	155	7	4,52	No	Si	0	1	6	0	0	7	0
13	115	0	0	No	No	0	0	0	0	0	0	0
14	250	4	1,6	No	Si	0	4	0	0	0	4	0
15	87	3	3,45	No	Si	0	0	3	0	0	3	0
16	76	1	1,32	No	Si	0	1	0	0	0	1	0
17	150	0	0	Si	No	0	0	0	0	0	0	0
18	90	0	0	Si	No	0	0	0	0	0	0	0
19	180	3	1,67	No	Si	0	3	0	0	0	3	0
20	128	0	0	No	No	0	0	0	0	0	0	0
21	47	0	0	No	No	0	0	0	0	0	0	0
22	33	0	0	No	No	0	0	0	0	0	0	0

CAPÍTULO IX

PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Perfil serológico y por PCR de *Lawsonia intracellularis* en cerdos de distintas edades en granjas porcinas de la República Argentina. Corrales Morales, P.J., Pelliza, B.R.; Tamiozzo, P.J.; Carranza, A.I.; Illanes, N.; Bertone J.; Ambrogi A. 2009. Revista de Medicina Veterinaria. 90 (3/4): 34-38.

Lawsonia intracellularis Infection Dynamic By Clinical Manifestation, Serology And PCR In Farms Of Swine. P. Corrales, P. Tamiozzo, B. Pelliza, A. Carranza, N. Illanes, R. A. Ambrogi, A. Ambrogi. P 03.076. pag.295. 20th International Pigs Veterinary Society Congress. Durban. South Africa. 22 al 26 de junio de 2008.

Presencia de *Lawsonia intracellularis* y su Relación con Manifestaciones Clínicas en Cerdos de la República Argentina. Corrales, P.J.; Carranza, A.I.; Pelliza, B.R.; Bertone, J.; Tamiozzo, P.; Illanes, N.; Ambrogi, A. 13 Congresso Da Abraves 16 a 19 de octubre de 2007. Florianópolis – SC. Brasil.

Detección de *Lawsonia intracellularis* por la Técnica de PCR En Muestras de Materia Fecal. Corrales, P.; Bertone, J.; Illanes, N.; Tamiozzo, P.; Ambrogi, A. 295. VIII Congreso Nacional De Producción Porcina. V Congreso De Producción Porcina Del Mercosur. XIV Jornadas De Actualización Porcina. 22, 23 Y 24 De Mayo de 2006. Córdoba, Argentina.

Diagnóstico de *Lawsonia intracellularis* en Cerdos con Diarrea, por Técnicas Histoquímicas, Inmunohistoquímica Y PCR. Bertone, J.; Corrales, P.; Illanes, N.; Tamiozzo, P.; Redondo, L.; Romanini, S.; Yaciuk, R.; Ambrogi, A. XVII Reunión

Científico técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. 29 al 31 de octubre de 2008. Santa Fe, Argentina.

Perfil serológico y por PCR de *Lawsonia intracellularis* en cerdos de distintas edades en granjas porcinas de la República Argentina.

Corrales Morales, P.J.¹; Pelliza, B.R.¹; Tamiozzo, P.J.¹; Carranza, A.I.¹; Illanes, N.¹; Bertone J.¹; Ambrogi A.¹

1, Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad nacional de Río Cuarto.
Ruta 36 km 601, Río Cuarto, Córdoba, C.P. 5800. República Argentina.
*Correo electrónico: ptamiozzo@ayv.unrc.edu.ar

Palabra clave

Lawsonia intracellularis, Cerdos, Enteropatía proliferativa porcina, Diagnóstico, Prevalencia.

Keywords

Lawsonia intracellularis, Pigs, Porcine Proliferative Enteropathy, Diagnosis, prevalence.

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue determinar el perfil de *Lawsonia intracellularis* por medio de serología (ELISA) y PCR en cerdos de distintas edades en granjas de nuestro país y determinar la prevalencia predial en la República Argentina. Se realizó un estudio de corte transversal, en 22 establecimientos de la zona de mayor producción porcina del país. Se tomaron muestras de sangre y materia fecal de 10 cerdos de 8, 15 y 21 semanas de edad, para ELISA y PCR respectivamente. El 90,9% de las granjas fueron seropositivas, el 57% fueron PCR positivas. Además, los resultados de PCR, mostraron que para las 8, 15 y 21 semanas se encontraron 5, 21 y 30 muestras positivas en 3, 6 y 10 establecimientos respectivamente. Se concluyó que *L. intracellularis* está presente en forma endémica en el país y dentro de los establecimientos, que el mayor impacto de la enfermedad se da alrededor de las 15 semanas de edad, y que la utilización de ambas técnicas juntas en diferentes edades permite identificar la prevalencia de portadores/eliminadores y la prevalencia de la enfermedad, lo que facilitaría el desarrollo de protocolos de control y tratamiento para minimizar el impacto de la enfermedad.

SUMMARY

Serological and PCR profile of *Lawsonia intracellularis* in pigs of different ages belonging to swine farms in the Argentine Republic.

The purpose of this study was to determine the profile of *Lawsonia intracellularis* using serology (ELISA) and PCR in pigs of different ages at farms in our country and to determine the farm-prevalence in Argentina. A cross-sectional study was performed in 22 farms of the main swine production area of the country. Blood and feces of 10 pigs at 8, 15 and 21 weeks of age were sampled for ELISA and PCR respectively. Seropositivity was found in 90,9% of farms, of which 57% were PCR positive. In addition, PCR results showed that for pigs 8, 15 and 21 weeks old there were 5, 21 and 30 positive samples at 3, 6 and 10 farms respectively. It was concluded that *L. intracellularis* is endemic in the country and within the farms; the main impact of the disease occurs about 15 weeks of age and that using both techniques together at different ages to identify the prevalence of carrier pigs and the prevalence of the disease, could contribute to the development of monitoring and treatment protocols to minimize the impact of the disease.

Introducción

El 88% de las granjas porcinas del país se concentran en las provincias de Córdoba, Buenos Aires y Santa Fé⁴, ubicándose luego las provincias limítrofes, las que han tenido un significativo proceso de desarrollo, similares a los países de mayor producción a nivel mundial. Se ha señalado que en estos sistemas altamente desarrollados, las enfermedades entéricas tienen un alto impacto económico siendo, en diferentes países, *Lawsonia intracellularis* la más prevalente con un 60 al 90% de pjaras positivas^{15, 12}.

Como señalaron Guedes y col⁷ y Gebhart³, *L. intracellularis* ha sido identificada como el agente causal capaz de producir al menos dos cuadros clínicos: la forma aguda, Enteritis Hemorrágica Proliferativa (EHP), que se manifiesta en animales de más de 16 semanas con diarrea sanguinolenta de fácil observación y que puede llevar a la muerte de los animales y la forma crónica, Adenomatosis Intestinal Porci-

na (AIP), o Enteropatía Proliferativa Porcina (EPP o subclínica), que como señalaron Hardge y col⁸ es la más frecuente y presumiblemente muchos cerdos no presentan una diarrea evidente. Esto se ha corroborado por los trabajos de Jacobson y col⁹ y Guedes⁵, cuando detectaron *L. intracellularis* en cerdos sin diarrea, pero con retraso en el crecimiento. Ello podría deberse, por un lado, a un largo período de incubación que según Gebhart³ es de 7 a 14 días, mientras que McOrist¹⁴ sugiere que en la mayoría de los animales a campo ésta puede durar entre 2 a 3 semanas y por otro lado que la mortalidad es nula o como máximo de un 5%⁸.

Esta característica subclínica, que la hace poco visible, quizás sea uno de los mayores problemas en reconocer a nivel predial y nacional el real impacto de esta enfermedad. Es por ello que varios países han desarrollado sistemas de monitoreo usando distintas técnicas diagnósticas. En un estudio en Dinamarca, *L. intracellularis* fue considerada el agente más preva-

lente, porque de 79 establecimientos muestreados el 93,7% fueron encontrados positivos al agente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)²¹. Por medio de la técnica de PCR Pozo¹⁹ detectó un 35% de los cerdos de 12 a 17 semanas de edad eliminadores de *L. intracellularis* por materia fecal, mientras que Guedes⁵ fue capaz de encontrar el agente en cerdos hasta 12 semanas después de que estos habían comenzado con diarrea. Según Gebhart³ la especificidad de la técnica puede llegar hasta el 92%, pero su sensibilidad puede variar del 39 a 72%, debido a los factores inhibidores que posee la materia fecal, por ello Jacobson y col⁹ recomiendan el uso de kits específicos para extraer el DNA que inhiban a aquellos factores.

Las técnicas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la inmunoperoxidasa (IP) han sido usadas a nivel mundial para estudios de prevalencia y dinámica de la enfermedad. Guedes y col⁶ utilizaron IFI para determinar por seroconversión la dinámica

de la enfermedad, demostrando que la mayor seropositividad se daba entre las 19 y 22 semanas de edad, y de 3 a 6 semanas después de aparecer los síntomas.

En Argentina, en un estudio serológico por IFI, se determinó que el 76,6% de 30 explotaciones fueron positivas, encontrando una prevalencia intrapredial que varió del 57,7 al 90,1%¹⁸.

En la actualidad se ha comenzado a utilizar la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA), la que según Carvajal y col², tiene una sensibilidad y especificidad del 97 y 98% respectivamente. El uso de esta técnica les permitió, en un estudio realizado en España y Portugal, demostrar que la seroconversión de *L. intracellularis* se produjo entre las 13 y 18 semanas de vida y que la prevalencia en la Península Ibérica era del 98%.

Por esto se consideró importante la utilización de dos técnicas diagnósticas en cerdos de diferentes edades, para identificar portadores/eliminadores por PCR y seroconversión de animales por ELISA, resultado que facilitaría el desarrollo de apropiados protocolos de control y tratamiento, para minimizar el impacto de la enfermedad.

Por lo tanto los propósitos del presente estudio fueron:

- 1) Determinar el perfil de *L. intracellularis* por medio de serología y PCR en cerdos de distintas edades en granjas de distintas provincias de nuestro país.
- 2) Determinar la prevalencia predial del agente en la República Argentina.

Materiales y métodos

Población de animales y granjas

Para definir el número de animales a muestrear en cada granja para determinar presencia o ausencia de cerdos positivos a las 8, 15, y 21 semanas de vida, y poder establecer el perfil de *L. intracellularis*, se muestrearon 10 animales por categoría, utilizando una confianza del 95% y una prevalencia estimada del 30%, resultando un total de 30 muestras por establecimiento.

Se realizó un estudio de corte transversal entre julio y octubre de 2006. Se coordinó con cada productor una fecha de visita. Al momento de la misma se registró el número de madres y una vez dentro del establecimiento, se ingresó a las salas que contenían los animales de 8, 15 y 21 semanas de edad, comenzando por los más jóvenes. En cada faja etaria se extrajo al azar sangre y materia fecal de 10 animales por categoría.

Los establecimientos fueron seleccionados utilizando un método de muestreo por conveniencia²³, la condición para estar incluidos en la muestra, era que contaran con etapas productivas de parto a terminación y que su ubicación

ayudara a cubrir las diferentes provincias de mayor producción porcina del país. Para la selección de los establecimientos se contó con la disponibilidad ofrecida por los productores.

Para detectar la prevalencia se requirió de 27 granjas, considerando una prevalencia estimada del 80%, un nivel de confianza del 95% y un error del 15%. Para el cálculo del tamaño de la muestra y ajuste por tamaño, se consideraron 280 establecimientos de ciclo completo en la Argentina según GITEP⁴ y se utilizaron las formulas citadas por Thrusfield²³, quedando una vez realizado el ajuste un número de granjas a muestrear de 24. Basándose en estos datos si la prevalencia medida coincide con la esperada, entonces la prevalencia verdadera estará entre 59,7 – 94,3. Finalmente se trabajó con 22 establecimientos, debido a que no se pudo concertar con algunos productores. Los mismos se encontraban distribuidos de la siguientes manera: seis en la provincia de Córdoba, cinco en la provincia de Buenos Aires, cuatro en Santa Fe, dos en Tucumán, dos en Entre Ríos, uno en La Pampa, uno en San Juan y uno en San Luis; abarcando el muestreo las siete provincias de mayor producción porcina del país. El promedio de madres del total de granjas fue de 810 con un mínimo de 100 y un máximo de 4200.

Procesamiento de las muestras

Dentro de las 18 hs de extraída la sangre (30 muestras por establecimiento), las muestras fueron centrifugadas a 750 x g por 10 min a 4°C y los sueros obtenidos congelados a -70°C hasta el momento de su procesamiento. Para detectar la presencia de anticuerpos contra *L. intracellularis* se utilizó el kit comercial ELISA (Enterisol® Ileitis-ELISA, Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Alemania de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los sueros cuyos valores de densidad óptica (DO) fueron mayores a las del punto de corte fueron considerados positivos, el resto negativos.

Para el procesamiento de la materia fecal (30 por establecimiento) por PCR se usaron los partidores descriptos por Jones y col¹⁶, amplificando parte del gen *lyase-like*, obteniendo productos de 319 pb, no se realizó la re-amplificación del producto de la primera reacción. El ADN fue extraído con el Kit comercial QIAamp stool mini kit (Qiagen, Duesseldorf, Alemania). La reacción fue realizada en un ciclador térmico Techne (Genius, Vermont, Estados Unidos de Norte América) con una etapa inicial de 95°C por 15 min., luego 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 56°C por 2 min., y 72°C por 30 seg., seguida de una extensión final de 72°C por 7 min., usando 5 ul de ADN templado en un volumen final de 25 µl conteniendo: 0.2 mM de

cada dNTPs, 0.6 µM de cada partidore, 1.5 mM de Cl₂Mg y 1 U de Taq (Platinum® Taq DNA Polimerasa, Invitrogen, Argentina). Cada cinco muestras, se incluyó como control negativo el cotel sin muestras de ADN y cada quince muestras, se usó como control positivo de la reacción, ADN de *L. intracellularis* extraído de la vacuna viva de Ileitis (Enterisol® Ileitis Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Alemania) que se incluía en la última posición.

Para minimizar el riesgo de contaminación, cada paso de la PCR fue realizado en habitaciones separadas. El producto de la PCR fue corrido en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 µgrs/ml) a 70 v. por 1 hora aprox. y visualizado en un transiluminador.

Análisis de datos

Para obtener el perfil de *L. intracellularis*, se determinó la frecuencia de animales positivos por serología y PCR para cada faja etaria, para ello se utilizó como denominador el total de sueros testeados para cada edad de los establecimientos positivos.

Se determinó la prevalencia de granjas positivas a *L. intracellularis* por serología y por PCR, realizándose un intervalo de confianza al 95% exacto para una proporción, cuando el n muestral es menor que 100.

Se determinó la distribución de la presencia del agente (en cerdos de cualquier edad) por provincias por serología y por PCR, además de la prevalencia intragranjas, considerando sólo el muestreo de la semana²¹.

Se compararon los resultados de serología y PCR para determinar momento de detección de cada una de las técnicas utilizadas.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS Versión 11.5.1. 2002.

Resultados

De las 660 muestras de sangre colectadas, se procesaron sólo 650 por serología, debido a la indisponibilidad de diez sueros de animales de 21 semanas de edad. A las 8 semanas de edad se detectó en siete establecimientos sólo un animal seropositivo en cada uno de ellos, entre 1 y 2 en 10 establecimientos a las 15 semanas y entre 3 y 9 fueron a las 21 semanas de edad en 18 granjas. La frecuencia promedio (y valores máximos y mínimos) para cada faja etaria se muestran en el gráfico 1.

De los 22 establecimientos muestreados, veinte (90,9%), IC 95% (70 - 98,8) fueron positivos por ELISA. En todas las provincias se encontraron establecimientos seropositivos a *L. intracellularis*: Córdoba 100% (6/6), Buenos Aires 100% (5/5), Santa Fé 100% (4/4), Tucumán

50% (1/2), Entre Ríos 50% (1/2), La Pampa 100% (1/1), San Juan 100% (1/1) y San Luis 100% (1/1).

Respecto a la PCR, de un establecimiento no se pudieron procesar las muestras de materia fecal, por lo que se procesaron 630 muestras (210 para cada faja etaria). De los 21 estableci-

mientos considerados, 12 (57%), IC 95% (36 – 78) resultaron positivos. En los muestreos de 8, 15 y 21 semanas de edad, se encontraron 5, 21 y 30 muestras de materia fecal positivas en 3, 6 y 10 establecimientos respectivamente. La frecuencia promedio (y valores máximos y mínimos) para cada

faja etaria se muestran en el gráfico 2. Los resultados de PCR positivos por provincias fueron los siguientes: Córdoba 50% (3/6), Buenos Aires 60% (3/5), Santa Fé 50% (2/4), Tucumán 100% (1/1), Entre Ríos 50% (1/2), La Pampa 100% (1/1), San Juan 100% (1/1) y San Luis 0% (0/1).

Gráfico 1.

Perfil serológico, frecuencia promedio y valores máximos y mínimos, para cada faja etaria del total de establecimientos positivos.

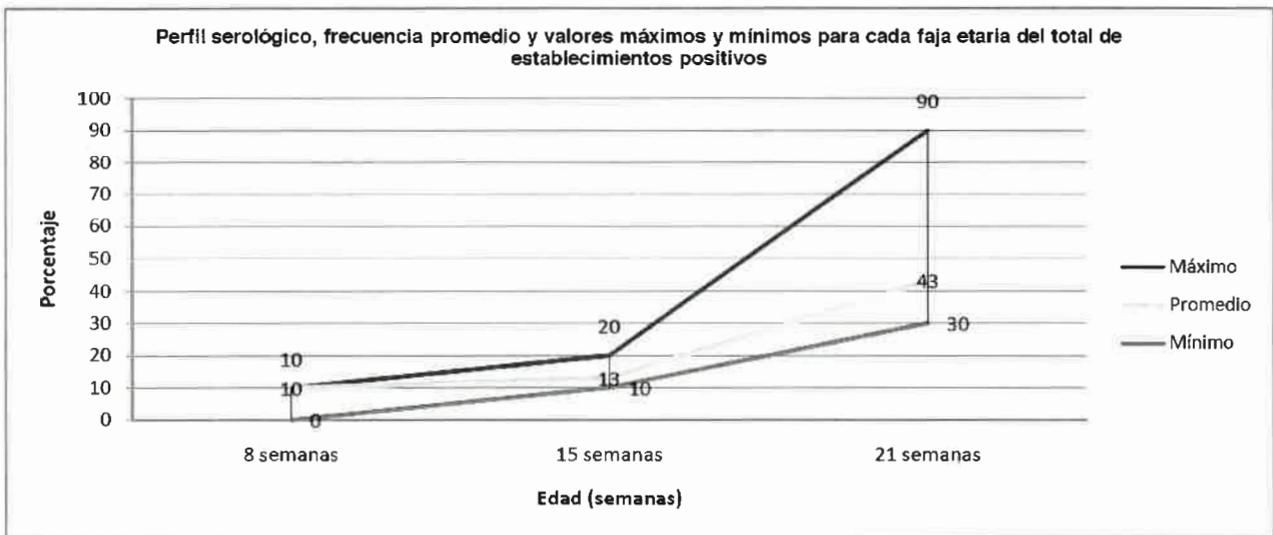
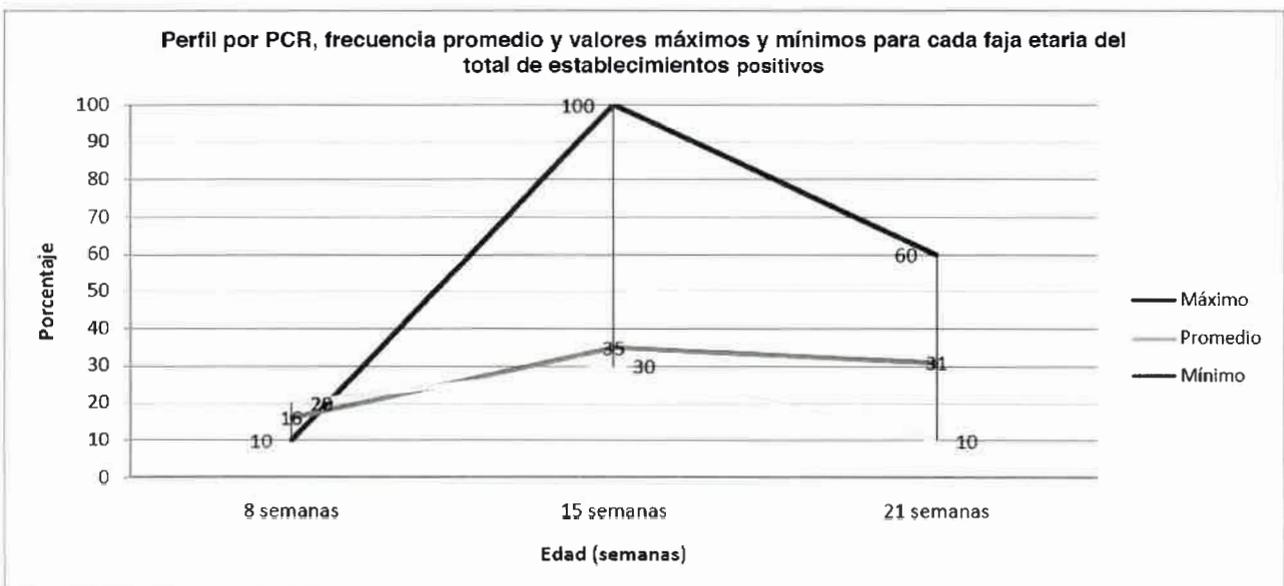


Gráfico 2.

Perfil por PCR, frecuencia promedio y valores máximos y mínimos para cada faja etaria del total de establecimientos positivos.



Discusión

La característica enzoótica de esta enfermedad, fue señalada por Mc Orist y Gebhart¹⁵, Lawson y Gebhart¹², cuando demostraron que en varios países estaba presente con una prevalencia del 60% al 90% en los establecimientos. Como se ha visto en este trabajo el 90.9% IC 95% (70-98,8) de las pjaras fueron positivas, lo que estaría indicando que la prevalencia de *L. intracellularis* en esta zona está entre esos valores coincidiendo con lo planteado por varios autores a nivel mundial.

En todas las provincias de Argentina que fueron muestreadas, se encontraron establecimientos con serología positiva a *L. intracellularis*, destacando que en Córdoba, Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, La Pampa, San Juan y Tucumán se encuentran más del 80% del total de madres existentes en nuestro país, indicando una amplia distribución. La prevalencia serológica media intrapredial, registrada sin tener en cuenta la edad de los animales fue 14,69% con un IC 95% (10,54 – 18,84 [Datos inéditos]), valores alejados de los encontrados por Perfumo y col¹⁸ donde observaron una prevalencia entre el 57% y el 90%, en cerdos de 90 a 100 días de vida. Si tenemos en cuenta los grupos etarios, en los animales de 21 semanas de edad se registró una frecuencia de animales positivos que varió entre un 30% y un 90% por granja. Esto demostraría que los anticuerpos están siendo detectados con mayor precisión alrededor de las 21 semanas de edad, coincidiendo con lo planteado por Jacobson y col⁹, Stege y col²⁰, y Guedes⁷ quienes señalan que la presencia de la bacteria se da principalmente en animales de 19 a 22 semanas de edad.

Sin embargo, en este estudio se comenzó a detectar anticuerpos a partir de las 8 semanas, indicando una infección a muy temprana edad, es coincidente con Burch¹ que plantea que la EPP en sus formas crónicas y subclínicas se dan en animales de 6 a 16 semanas. De los siete establecimientos positivos a las 8 semanas, tres resultaron negativos en los posteriores muestreos serológicos, lo que podría estar marcando resultados falsos positivos o inmunidad pasiva, sin embargo, uno de éstos establecimientos resultó positivo por

PCR a las 21 semanas de edad, coincidiendo con Ohlinger¹⁷ quién plantea que *L. intracellularis* es excretada en las heces alrededor de 2-4 semanas antes de la seroconversión y que partir de ese momento la frecuencia disminuye de forma significativa y en el momento del sacrificio sólo se detectan animales positivos de forma aislada.

Por otro lado, Mauch y Bielkei¹³, estudiando establecimientos problemas encontraron serología positiva desde las 5 hasta las 26 semanas de edad, en coincidencia con Just y col¹¹ pero señalan que la seroconversión se presentó entre las 12 a 16 semanas a diferencia de lo hallado en el presente estudio. Sin embargo, podríamos decir que la detección de al menos un positivo en esta etapa, sumado a la seroconversión que se demostró a las 15 semanas de edad indicaría que el agente puede impactar tanto a la edad temprana cercana a las 8, como a las 15 semanas siendo esta última la más frecuente y por ello el mayor porcentaje de positivos a ELISA a las 21 semanas de edad.

En cuanto a la prevalencia intrapredial por PCR una media de 8,63% un desvío de IC95% (3,1-14,12 [Datos inéditos]) coincidiendo con Ohlinger¹⁷ quién plantea que la prevalencia de las heces con resultado positivo puede alcanzar el 10%-40%.

Las muestras tomadas al azar de materia fecal permitieron identificar *L. intracellularis* en el 57% de los establecimientos, donde el porcentaje de animales positivos fue de 2.4%, 10.0% y 14.8% del total de muestreados (210) para cada faja etaria, indicando un incremento muy marcado entre el primer y el segundo muestreo, manteniéndose a las 21 semanas de edad, lo que podría estar en consonancia con los resultados serológicos demostrando que *L. intracellularis* se da principalmente alrededor de las 15 semanas, si bien puede comenzar más temprano y como señala Guedes⁵ el agente puede eliminarse por 12 semanas después de comenzada la diarrea, explicando quizás nuestros hallazgos donde de los establecimientos positivos, más del 50% lo fueron en 2 muestreos y hallados en mayor proporción hacia el final del muestreo a las 21 semanas.

El porcentaje de cerdos positivos a PCR fue bajo, y la proporción de establecimientos positivos a PCR fue menor

a los de serología, lo que podría estar determinado por lo que señalan Jacobson y col⁹ sobre la baja sensibilidad de esta técnica, si bien se usó un Kit de extracción de ADN específico para materia fecal. Estos resultados estarían mostrando la compleja epidemiología de la enfermedad, por lo que puede manifestarse de diferentes maneras, debido a la asociación con otras infecciones^{16,22}.

Dado los resultados obtenidos en este trabajo sumados a los hallazgos de Perfumo y col¹⁸ quienes demostraron que de 30 establecimientos de Argentina el 76.6% fue positivo por IFI y que la prevalencia intrapredial varió del 57,7% al 90,1% podríamos asumir que en nuestro país *L. intracellularis* se presenta en forma endémica en coincidencia con Hardge y col⁸, quién señaló esta característica.

Es probable que otros agentes y causas estén interactuando y que se deberían sumar hallazgos patológicos y etiológicos de animales sacrificados en estos establecimientos para poder concluir que en todos los casos se presentó la EPP en su forma crónica y/o subclínica y a la influencia de factores propios de cada establecimiento.

Por lo señalado en esta discusión podemos concluir que en los establecimientos estudiados en Argentina:

1. *L. intracellularis* está presente en forma endémica en el país y dentro de los establecimientos.
2. Su difusión se da principalmente entre las 8 y 15 semanas de edad y su mayor impacto alrededor de las 15 semanas.
3. La técnica de PCR permite detectar el agente durante su eliminación hasta aproximadamente las 15 semanas. La técnica de ELISA es útil cuando la enfermedad ya impactó en la población.
4. La utilización de las dos técnicas juntas en diferentes edades permite identificar la prevalencia de portadores/eliminadores y la prevalencia de la enfermedad, lo que facilitaría el desarrollo de apropiados protocolos de control y tratamiento para minimizar el impacto de la enfermedad.

Bibliografía

1. **Burch DGS.** Controlling ileitis in the "Colitis" complex. Pig J. General section, 2000. 45:131-149.
2. **Carvajal A, Collazos J, García K, Osorio J, Rubio P.** Enteropatía proliferativa Porcina. Av Tecnol. Porc. 2006; 3 (5): 6-21.
3. **Gebhart CJ.** Aetiology of Proliferative Enteropathy (PE) - overview and research update. Research Update: 1st Novartis Animal Health European Swine Ileitis/Colitis Workshop, 2004. p. 5-10. Alpbach, Australia.
4. **GITEP.** Grupo de intercambio tecnológico de explotaciones porcinas. Anuario del sector porcino. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. 2003. Argentina.
5. **Guedes R.** Pathogenesis of subclinical Ileitis. The inside story. 2ND Boehringer Ingelheim IPVS Ileitis Symposium. 2006. P. 1-7. Copenhagen, Denmark.
6. **Guedes RMC, Gebhart CJ, Winkelman NL, Mackie-Nuss RA, Marsteller TA, Deen J.** Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. Can. J. Vet. Res. 2002; 66: 99-107.
7. **Guedes RMC, Gebhart CJ, Armbruster G A, Roggow BD.** Serologic follow-up a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative hemorrhagic enteropathy. Can J Vet Res. 2002; 66: 258-263.
8. **Hardge T, McOrist S, Ohlinger V, Roof M, Rubio P, Voets H, Walter D.** Enteropatía proliferativa porcina – Ileítis. Enterisol® Ileitis. Manual técnico. Boehringer Ingelheim. 2005 ; 7 – 30.
9. **Jacobson M, Hård af Segerstad C, Gunnarsson A, Fellström C, de Verdier 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.
10. **Jones GF, Ward GE, Murtaugh MP, Lin G, Gebhart CJ.** Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont, in feces by polymerase chain reaction. J.Clin. Microbiol. 1993; 31 (10): 2611-2615.
11. **Just SD, Thoen CO, Thacker BJ, et al.** Monitoring of *Lawsonia intracellularis* by indirect serum immunofluorescence assay in a commercial swine production system. J Swine Health Prod. 2001; 9 (2): 57-61.
12. **Lawson GHK, Gebhart CJ.** Review: Proliferative Enteropathy. J. Comp. Path. 2000; 122 : 77-100.
13. **Mauch CHY, Bilkei G.** Effect of sow parity on the transmission of *Lawsonia intracellularis* to piglets. Vet Rec. 2005; (155). 532.
14. **McOrist S.** Epidemiology of the acute (PHE) and chronic (ileitis, PIA) forms of PE. Research Update: 1st Novartis Animal Health European Swine Ileitis/Colitis Workshop. 2004; 13-15. Alpbach, Australia.
15. **McOrist S, Gebhart CJ. Porcine proliferative enteropathy. In: Straw, B.E. et al. (ed).** Diseases of Swine, 8th ed. Iowa State University Press.1999; 521-534.
16. **Moller K, Jensen T, Jorsal S, Láser T, Carstensen B.** Detección de *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, salmonella enterica, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhea among growing pigs. Vet Microbiol. 1998; (62). 59-72.
17. **Ohlinger V.** Ileitis: Diagnostico Porci. 2005; 59-68.
18. **Perfumo CJ, Machuca M, Cappuccio J, Piñeyro P, Quiroga A, Vigo G.** Situación actual de las enfermedades que afectan la producción porcina en la Argentina. Cuadros digestivos asociados a *Salmonella spp.* y *Lawsonia intracellularis*. V Congreso de producción porcina del MERCOSUR, VIII Congreso nacional de producción porcina y XIV Jornadas de actualización porcina. 2006; 221-224. Córdoba, Argentina.
19. **Pozo J.** Epidemiología de la enteropatía proliferativa porcina en España: Estudio de la infección en condiciones naturales e infección experimental en lechones lactantes. [Tesis Doctoral] Universidad de León, España. 2001.
20. **Stege H, Jensen T, Moller K, Vestergaard K, Bækbo P, Jorsal S.** Infection dynamics of *Lawsonia intracellularis* in pig herds. Vet microbial; 2004 (104): 197-206.
21. **Stege H, Jensen TK, Møller K, Bækbo P, Jorsal SE.** Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. Prev. Vet. Med. 2000; 46: 279-292.
22. **Thompson JR, Smith WJ, Murray BP.** Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. Veterinary Record 1998; (7): 235-239.
23. **Thursfield M.** Epidemiología Veterinaria. 1ra edición. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. 191- 205.

Presentaciones en Congresos:

- Corrales P, Tamiozzo P, Pelliza B, Carranza A, Illanes N, Ambrogio R, Ambrogio A.** *Lawsonia intracellularis* infection dynamic by clinical manifestation, serology and PCR in farms of swine. 20 th IPVS Congress.2008. P-03.076. p.295 Durban. South Africa.
- Corrales PJ, Carranza AI, Pelliza BR, Bertone J, Tamiozzo P, Illanes N, Ambrogio A.** Presencia de *Lawsonia intracellularis* y su relación con manifestaciones clínicas en cerdos de la República Argentina. 13 Congreso da Abraves.2007. Florianópolis – SC. Brasil.

1000?

6t