

# Origen bacteriano y parasitario de las diarreas en transición en Francia

FUENTE:<http://www.exopol.com>

**Miguel Angel Romero (1), Frederic Bernard (2), Stephane Pronost (3), Guillome Fortier (3), Daniel Loïsnard (3), Carol Bisson (3) y Sylvie du Montier (3).**

Trabajo publicado previamente en: Anaporc 180, 5-30

## 1. INTRODUCCIÓN

Este estudio fue realizado en Francia gracias a la colaboración de **SANOFI SANTE NUTRITION ANIMALE**, Libourne y el **Laboratorio Departamental FRANK DUNCOMBE**, Calvados. El resultado de este estudio a sido la puesta a punto de un test PCR sobre *Lawsonia intracellularis* (permite el diagnostico tanto sobre heces como sobre mucosa de íleon). Esta bacteria es el origen de la Enteropatía proliferativa o Ileitis Hemorrágica. Por otra parte hemos obtenido importantes avances en el diagnostico rutinario de *Brachyspira spp.* Además realizamos un diagnostico completo sobre la mayoría de agentes bacterianos y parasitarios que son origen de problemas digestivos en transición.

En Francia Dimetridazol y Óxido de Zinc fueron utilizados de manera generalizada en la medicación en el pienso de los cerdos para la prevención de la aparición de diarreas. A raíz de su desaparición la incidencia de aparición de diarreas, principalmente en la fase de transición ha sido de mayor importancia.

En este estudio se ha intentado establecer cual es la importancia de cada uno de los gérmenes estudiados, para así poder aportar datos objetivos a los profesionales del sector, permitiendo valorar cual es la frecuencia de aparición de cada agente.

Por otra parte la técnica PCR para *Lawsonia intracellularis* fue realizada por primera vez en Francia. A raíz de este estudio este método de análisis es ofertado por dos laboratorios en Francia para diagnostico de campo. Además la técnica de diagnostico bioquímico para *Brachyspira spp.* fue simplificada notablemente. Gracias a este estudio fue diagnosticada por primera vez en Francia *Brachyspira pilosicoli*.

Actualmente en Francia hay dos laboratorios (LD Frank Duncombe y LABOFARM) que siguen trabajando en la mejora del diagnostico por PCR de *Lawsonia intracellularis* y del bioquímico de *Brachyspira spp.* Los resultados de estas investigaciones posiblemente serán publicados en un periodo breve de tiempo.

En este estudio han participado 76 explotaciones de ganado porcino, en su gran mayoría de ciclo cerrado, distribuidas por la mayor parte del territorio francés, pero fundamentalmente ubicadas en las regiones de Bretaña y País del Loira. Hemos contado con la participación de la mayor parte de cooperativas y asociaciones de ganado porcino de Francia.

## 2. PATOLOGIAS ESTUDIADAS

Sobre estas 76 explotaciones fueron analizadas sistemáticamente los siguientes agentes patógenos:

AGENTE	ENFERMEDAD
Lawsonia intracellularis	Enteropatía proliferativa
Brachyspira hyodisenteriae	Disentería hemorrágica
Brachyspira pilosicoli	Espiroquetosis cólica
Brachyspira innocens	Diarreas en el caso de cepas próximas a la cepa B 256 (J.P. Euzéby, 1997)
Campylobacter spp.	Diarrea
Clostridium perfringens	Clostridiosis
Salmonella spp.	Salmonelosis
E. coli hemolítico	Colibacilosis
Parásitos	Diarreas

En esta breve descripción sólo haremos referencia a aquellas de las que no se maneja habitualmente mucha información y que además hayan tenido una gran importancia en nuestro estudio:

## I. ENTEROPATÍA PROLIFERATIVA PORCINA (Lawsonia intracellularis)

### a. Generalidades :

La EPP es una enfermedad importante en el cerdo que provoca lesiones proliferativas en la mucosa del íleon llegando a afectar incluso el colon y el ciego, provocando en ocasiones melena, adelgazamiento y una disminución de los rendimientos zootécnicos del animal.

Esta enfermedad aparece generalmente entre 6 a 20 semanas de vida, habiendo sido descrita a 3 semanas de vida y puede afectar a animales en fases finales de cebadero o incluso cerdas de reposición.

La EPP ha sido descrita para otras especies como el caballo, el perro, la cobaya, el hurón, el hámster, el conejo, los ovinos, la rata o el zorro azul (*Alopex lagopus*).

### b. Etiología:

*Lawsonia intracellularis* ha sido oficialmente descrita en 1995. Anteriormente fue denominada como *Ileal Symbiont Intracellularis* o *Ileobacter intracellularis*. La descripción oficial es la siguiente: Bacilo incurbado, Gram -, no esporulado, sin flagelo que utiliza la fisión binaria para su multiplicación y no es cultivable sobre medios inertes. Se trata de una bacteria intracelular obligada.

*L. intracellularis* pertenece al grupo Delta de las *Proteobacterias*. Filogenéticamente se encuentra muy próxima de *Desulfovibrio sulfuricans*, siendo esta última de mayor tamaño, con flagelos, móvil y extracelular.

### c. Patogenicidad:

La infección se realiza por vía oral a partir de heces, probablemente en los primeros días de vida de la madre al lechón. Esta enfermedad no es erradicada mediante sistemas de destete precoz (MEW o sus modificaciones).

Si tenemos en cuenta que el periodo de infección de la EPP es entre 2 y 3 semanas es posible atribuir un papel protector a inmunidad calostrual frente a EPP pues las lesiones originadas por *L. intracellularis* no aparecen hasta 6 semanas de vida.

La penetración de la bacteria en los enterocitos se realiza por endocitosis y se produce 5 a 7 días post-infección a pesar de que la aparición de las lesiones se produce 2 -3 semanas más tarde. La difusión bacteriana en el intestino se realiza a través de los enterocitos que se van a dividir, originando de esta manera las lesiones típicas de esta enfermedad. Este ciclo es próximo al de las Rickettsias. Otras bacterias como *Campylobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.* y *Brachyspira spp.* que son origen de patologías digestivas, posiblemente aprovechen las lesiones previamente originadas por *L. intracellularis*.

Los microfilamentos celulares permiten la penetración en los enterocitos de *L. intracellularis* y su inhibición química impide o reduce el nivel de infección en los cultivos celulares.

La proliferación de enterocitos inmaduros colonizados por *L. intracellularis* origina un engrosamiento de la mucosa digestiva y la aparición de formaciones adenomatosas en el intestino. Se produce una pérdida de capacidades digestivas de absorción y digestión. Por otra parte un número insuficiente de enterocitos produce una disminución de la producción de hormonas autocrinas. Son estas las que inhiben la proliferación de las células de las criptas.

### d. Síntomas clínicos:

Podemos agrupar estos síntomas en dos tipos:

1. Forma no hemorrágica: con una morbilidad entre un 10 y un 30 %, con curación espontánea en algunos casos. La mortalidad media originada es de un 2 % (variación entre 0 y 5 %). Las infecciones secundarias pueden provocar diarreas continuas o recurrentes. Como síntomas que podemos destacar es un aumento del IC, una disminución de la GMD, un aumento de heterogeneidad en los lotes y en

algunos casos la presencia de diarreas negruzcas o grises. En algunos casos el adelgazamiento puede ser muy marcado al igual que en la forma hemorrágica.

2. Forma hemorrágica: es la más frecuente en los cerdos entre 4 y 18 meses. Esta forma afecta también a cerdas de renuevo y a primíparas. La morbilidad media es de un 6 %, pudiendo variar entre 5-20 %. La mortalidad puede llegar a ser hasta de un 6 %. Además de apreciar los síntomas anteriormente descritos para la forma no hemorrágica (mayor incidencia de diarreas), se presenta una aparición pasajera de fiebre, palidez y degradación general y en algunos casos abortos en cerdas debido a la fiebre experimentada.

a. **Lesiones macroscópicas:**

1. Forma no hemorrágica:

1.a Adenomatosis intestinal: afecta fundamentalmente a los últimos 50 cm del íleon. Puede afectar al colon y a parte del colon ascendente. Las lesiones se caracterizan por un espesamiento y endurecimiento del intestino originados por un edema subseroso y mesentérico. En el intestino grueso se pueden originar pólipos. En las lesiones que se originan se observa una desaparición de las células caliciformes.

1.b Ileitis regional: el intestino aparece en forma de "manguera de riego". A la autopsia se encuentra una hipertrofia muscular, ulceraciones y tejido de granulación mezclado con mucosa sana.

1.c Enteritis necrótica: hay aparición de infecciones secundarias y la mucosa aparece con necrosis caseosa de color amarillo o gris.

2. Forma hemorrágica o enteritis hemorrágica proliferativa.: en jóvenes adultos es la forma más comúnmente observada. Las lesiones se circunscriben mayoritariamente al íleon. Aparecen coágulos sanguíneos en el íleon y sangre no coagulada en el colon. Las hemorragias no están asociadas a una destrucción tisular importante.

f. **Lesiones microscópicas:** aparece una hiperplasia marcada de los enterocitos intestinales, con proliferación de las células mucosales. En el interior de los enterocitos aparecen las bacterias en el citoplasma de los mismos.

**g. Respuesta inmunitaria:**

A nivel serológico se aprecia la presencia de Ig M y a un nivel muy débil Ig G. En los enterocitos tan sólo se encuentra Ig A e Ig M que se van a acumular, desconociéndose si es la bacteria la que impide la excreción de Ig A o bien son los enterocitos los que concentran estas Ig A alrededor de las bacterias.

Los enterocitos inmaduros no exponen los antígenos de histocompatibilidad de clase II (presentes sobre los enterocitos maduros), los cuales son necesarios para la respuesta inmune. Por lo tanto el linfocito citotóxico CD 8+ no puede actuar sobre estos enterocitos. Por otra parte la infiltración local de linfocitos es muy débil. Por todo esto cabe pensar que la posibilidad de encontrar vacunas es por el momento remota.

## **II. DISENTERÍA HEMORRÁGICA (*Brachyspira hyodysenteriae*) y ESPIROQUETOSIS CÓLICA (*Brachyspira pilosicoli*).**

a. **Etiología:**

El género *Brachyspira*, perteneciente a la familia *Spirochaetaceae*, tiene la morfología de un *Treponema* de grandes dimensiones (6-13 µ m) por lo que anteriormente se utilizaba la denominación de *Treponema*. Son bacterias flexuosas y helicoidales con diámetros comprendidos entre 0,2 y 0,4 µ m. Son bacterias móviles gracias a su flagelo periplásmico, que les permite movimientos de flexión, translación y rotación.

El género *Brachyspira* contempla varias especies, que se agrupan de la siguiente manera:

- *Brachyspira hyodysenteriae*,
- *Brachyspira pilosicoli* (*Brachyspira coli* + *Brachyspira intermedius*)
- *Brachyspira innocens*

Las características bioquímicas diferenciales de estas bacterias se clasifican de la siguiente manera:

	Hemólisis	Indol	Hipurato	$\alpha$ gal *	$\alpha$ glu **	$\beta$ glu **
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	Intensa	+	-	-	+	+
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	Débil	-	-	+/-	+/-	+
<i>Brachyspira intermedius</i>	Débil	+	-	-	+	+
<i>Brachyspira coli</i>	Débil	-	+	+	-	-

$\alpha$  gal \* = alfa-galactosidasa;  $\alpha$  glu \*\* = alfa-glucosidasa;  $\beta$  glu \*\* = beta-glucosidasa

### a. Patogenia

El periodo de infección varía entre 1 a 2 semanas. La morbilidad para *S. hyodysenteriae* puede ser hasta del 90 %, mientras que para *S. pilosicoli* varía entre 5-50 % según autores. La mortalidades hasta de un 30 % para el primer caso e inferior al 2 % para el segundo.

La movilidad de estas bacterias tiene un papel decisivo en la patogenia, puesto que experiencias realizadas con mutantes de los genes *flaA* (codifica para una proteína de 44 kdal presente en los flagelos) y *flaB1* (codifica para una proteína de 32 kdal presente en el corpúsculo basal) colonizaban mal la mucosa del ciego del ratón, provocando mínimas lesiones y siendo incapaces de originar los síntomas clínicos que aparecen en las lesiones de disentería hemorrágica (Euzéby, UNCAAB 1997).

*S. hyodysenteriae* rodea completamente a los enterocitos, mientras que *S. pilosicoli* se adhiere al polo apical de los mismos. *Brachyspira innocens* parece carecer de poder de adhesión.

El género *Brachyspira* posee una hemolisina, que juega un papel importante en la sintomatología de la enfermedad. Este poder de hemólisis nos permite diferenciar clásicamente con la ayuda de tests bioquímicos *S. hyodysenteriae* del resto de *Brachyspiras*. Se desconoce si la esta diferente hemólisis se debe a una hemolisina distinta o bien a un nivel de producción diferente de hemolisina.

Por otra parte la membrana externa del género *Brachyspira* posee un lipopolisacárido (LPS) que también influye en la presentación de la patología, pues líneas de ratones poco sensibles a este LPS no se desarrollan lesiones (Nuessen, 1982). Posiblemente este LPS tenga influya en la infección estimulando la producción de IL 1 y de TNF e impidiendo el efecto lítico del complemento (Joens 1980).

### b. Sintomatología:

c.1 Disentería hemorrágica: Los cerdos aparecen inapetentes, malestar general y sed en muchos casos intensa. Algunos cerdos pueden presentar un adelgazamiento muy intenso. La fiebre aparecerá en los primeros estadios de evolución de la enfermedad. La diarrea variará en consistencia y color. Estas pueden variar desde pastosas y grises a contener sangre, mucus y fragmentos de materias necróticas.

Las formas clínicas de presentación de la enfermedad son aguda, crónica o atípica. Cuanto más aguda sea su presentación mayor contenido en sangre aparecerá en sangre y mayor será la mortalidad. A medida que la presentación pasa a fases subagudas o crónicas, la aparición en heces de mucus será mayor y la de sangre disminuirá. También el estado general del cerdo se resentirá en mayor medida en función de la gravedad del proceso.

c.2 Espiroquetosis cólica: Los síntomas clínicos son similares a los explicados anteriormente. Sin embargo la mucosidad en heces y la melena son de menor intensidad, siendo difícilmente apreciables.

c.3 Diarrea originada por *S. Innocens*: algunas cepas de *S. hyodysenteriae* como la P280 fuertemente hemolítica y muy próxima a *S. Innocens*, aislada de un caso de colitis hemorrágica, pueden ser el origen de diarreas en lechones. Esta posibilidad también ha sido apuntada por algunos autores suecos y por Euzéby, UNCAAB 1997. El haber encontrado en nuestros análisis en determinados casos únicamente *S. Innocens*, podría dar lugar a pensar en algunos de ellos en el origen patógeno de estas cepas entre otras posibilidades.

### c. Lesiones:

A nivel macroscópico la canal y las mucosas pueden aparecer pálidas. El intestino grueso aparece flácido y congestionado a causa del edema de la subserosa. Estas lesiones intestinales que van a afectar exclusivamente al colon y al ciego, contendrán un líquido maloliente de color marrón. La mucosa pasará de estar congestionada en las primeras fases a aparecer de escaso grosor al final. Las lesiones antiguas pueden aparecer recubiertas de pseudo-membranas. Las lesiones en el caso de la Espiroquetosis Cólica son de carácter menos grave y el contenido intestinal tiene un origen menos hemorrágico.

Microscópicamente, *S. hyodysenteriae* habrá llegado incluso hasta la lámina propia del intestino grueso, rodeando así a los enterocitos. Aparece una hiperplasia de las criptas epiteliales del colon. *S. pilosicoli* aparecerá en forma de falso borde sobre las células epiteliales del intestino grueso.

## 1. MATERIAL Y MÉTODOS

En cada una de las 76 explotaciones de donde se tomaron muestras se enviaron las muestras de heces de cinco lechones con edades comprendidas entre 10 y 12 semanas de vida. Las heces fueron recogidas en pocillos independientes y enviadas al laboratorio, recibiendo en un plazo máximo de 24 h. Estas muestras viajaron en recipientes isoterms y con un sistema de refrigeración que nos permitió recibirlas en perfecto estado de conservación. En el laboratorio 2 g de cada muestra fueron mezclados en un recipiente estéril. A partir de esta mezcla de las 5 muestras se realizaron todas las pruebas.

Por otra parte en el laboratorio pusimos a punto otra técnica que nos permitió realizar el diagnóstico por PCR de *L. intracellularis* a partir de raspados de mucosa ileal.

Las técnicas de identificación que realizamos de manera sistemática sobre las mezclas de excrementos fueron las siguientes:

AGENTE	ENFERMEDAD	TIPO DE DIAGNOSTICO
Lawsonia intracellularis	Enteropatía proliferativa	PCR
Brachyspira hyodysenteriae	Disentería hemorrágica	Cultivo sobre medio selectivo y posterior identificación bioquímica.
Brachyspira pilosicoli	Espiroquetosis cólica	Cultivo sobre medio selectivo y posterior identificación bioquímica.
Brachyspira innocens	Teóricamente apatógeno (notificación realizada Euzemy sobre la posibilidad de patogenicidad)	Cultivo sobre medio selectivo y posterior identificación bioquímica.
Campylobacter spp.	Diarrea	Cultivo sobre medio selectivo y posterior identificación bioquímica.
Clostridium perfringens	Clostridiosis	Cultivo sobre agar sangre (doble hemólisis), coloración de Gram y numeración. Positivo a partir de 10 <sup>6</sup> UFC/ml.
Salmonella spp.	Salmonelosis	Cultivo sobre medio selectivo (DCLS, SS, Urea, ONPG y serotipaje mediante suero específico)
E. coli hemolítico	Colibacilosis	Cultivo sobre agar sangre y EMB, agar y búsqueda del antígeno K-88 mediante la utilización de un suero específico (aglutinación).
Parásitos	Diarreas	Coprología (directa y por flotación)

1. PCR: la técnica utilizada para su realización fue la descrita por McOrist. Los ciclos utilizados para la PCR fueron de 94, 53 y 72 °C, por lo que pensamos que hemos realizado nuestras pruebas con una alta sensibilidad específica. Investigaciones en curso intentan mejorar esta técnica haciéndola mucho más rápida y menos costosa.

2. Para la detección de gérmenes anaerobios utilizamos una estación de cultivo anaerobia cuya atmósfera estaba constituida por 80 % de nitrógeno, 10 % de hidrógeno y 10 % de CO<sub>2</sub>. Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

- Agar sangre (AS): *Clostridium perfringens*.
- Agar sangre Brachyspira (ASS): *Brachyspira* spp. y *Campylobacter* spp.

El medio ASS era selectivo, evitando así la proliferación de gérmenes indeseados. La constitución del medio era la siguiente:

Tripticasa soja agar		40 g
Sangre de cordero		50 ml
Espectinomicina (solución 8 mg/ml)		200 mg
Colistina (solución 0.5 mg/ml)		6.25 mg
Vancomicina (solución 0.5 mg/ml)		6.25 mg
Rifampicina (solución 1 mg/ml)		12.5 mg
Espiramicina (solución 2 mg/ml)		25 mg
Agua desmineralizada		950 ml

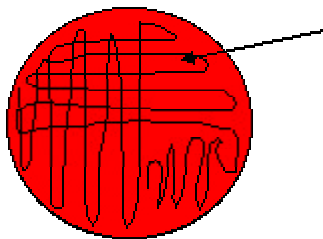
La sangre y las soluciones con los antibióticos fueron añadidos a una temperatura de 50 °C después de la utilización de un autoclave. El medio se repartió en placas de Petri a razón de 25 ml/placa.

#### 4. APORTACIONES REALIZADAS PARA LA MEJORA DEL CULTIVO Y LA DETECCIÓN DE BRACHYSPIRA SPP.:

1. Elección del tipo de siembra:

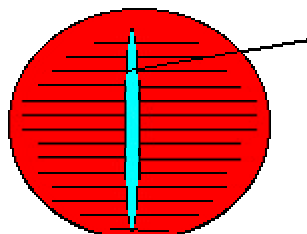
Realizamos dos tipos distintos de siembra y aplicamos dos tipos de filtros diferentes, para en este caso comprobar si las espiroquetas podían atravesarlo, sirviendo así de filtro (esquema nº 2). Además testamos una solución enriquecida que es utilizada comúnmente en bacteriología clásica, PolyVitex®, para comprobar si esto podría tener algún efecto beneficioso para el crecimiento de *Brachyspira* spp.

a. Método lineal:



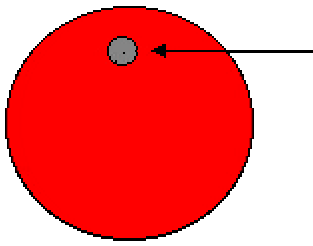
Siembra a partir de un escobillón contaminado

b. Método del bisturí:



Deposición de una solución de heces contaminadas

c. Método de los filtros:



Se deposita una gota de solución contaminada sobre un filtro de 1.2  $\mu\text{m}$  o de 1.5  $\mu\text{m}$ . Posteriormente utilizar el método de linear.

Sobre tres tipos de agar se sembraron soluciones contaminadas obteniendo los siguientes resultados:

	Método linear	Método del bisturí	Método con un filtro de 1.2 $\mu\text{m}$	Método con un filtro de 5 $\mu\text{m}$
Agar sangre	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Brachyspira poco abundante y no aislada</li> <li>○ Fuerte contaminación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brachyspira poco abundante pero aislada en el extremo de las estrías del bisturí</li> <li>• Fuerte contaminación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brachyspira poco abundante pero aislada</li> <li>• Rara contaminación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brachyspira poco abundante pero aislada</li> <li>• Muy rara contaminación</li> </ul>
Agar sangre Brachyspira	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Brachyspira abundante y aislada</li> <li>○ Contaminación en los bordes de las siembras</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brachyspira abundante y aislada en el borde de las estrías</li> <li>• Algunos contaminantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brachyspira poco abundante</li> <li>• Sin contaminación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brachyspira muy poco abundante</li> <li>• Sin contaminación</li> </ul>
Agar sangre Brachyspira enriquecido con PoliVitex	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Brachyspira abundante y aislada</li> <li>○ Contaminación en los bordes de las siembras</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brachyspira abundante y aislada en el borde de las estrías</li> <li>• Algunos contaminantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brachyspira poco abundante</li> <li>• Sin contaminación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brachyspira muy poco abundante</li> <li>• Sin contaminación</li> </ul>

b. Conclusiones:

- Brachyspira se desarrolla bien en los tres métodos, pero en algunos casos no obtenemos un cultivo puro, principalmente en el caso del AS, medio no selectivo y enriquecido.
- La utilización de PoliVitex no parece afectar a los resultados.
- Con el método de los filtros disminuimos las contaminaciones bacterianas, pero también la cantidad de bacterias que crecen en el medio. El movimiento en serpentina de la bacteria parece dificultar su paso a través de los filtros.
- Decidimos tener en cuenta de los resultados el método del bisturí en función de las bajas contaminaciones bacterianas y los elevados crecimientos obtenidos. El movimiento de Brachyspira le permite migrar hasta el final de las estrías originadas por la lámina del bisturí. Para mejorar la pureza del cultivo resembramos la muestra en otro medio ASS.

## 4.2 Elección del tipo de atmósfera.

Brachyspira se desarrolla en anaerobiosis, aceptando débiles cantidades de oxígeno. Nosotros testamos el crecimiento de *Brachyspira hyodisenteriae* en estación de anaerobiosis (80 % de nitrógeno, 10 % de hidrógeno y 10 % de CO<sub>2</sub>) y en jarras de anaerobiosis. El resultado de esta prueba fue que en las jarras de anaerobiosis no se observó crecimiento alguno hasta 7 días después de su siembra. En la estación de anaerobiosis se observó crecimiento de *S. hyodisenteriae* 24 horas después de su siembra.

Por lo tanto todas las pruebas fueron realizadas en la estación de anaerobiosis. Sin embargo según resultados obtenidos en otros laboratorios, el crecimiento de *Brachyspira hyodisenteriae* es viable en jarras de anaerobiosis.

## 3. Elección de la temperatura.

Testamos el crecimiento de *S. hyodisenteriae* y de *S. innocens* a 37 y a 42 °C, pues según Breyer's Manuel, las temperaturas óptimas de crecimiento de estas dos bacterias están comprendidas entre 37 y 40 °C. Estos resultados fueron los siguientes:

	37 °C	42 °C
Brachyspira hyodisenteriae	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Abundante</li><li>○ Fuerte β hemólisis en los bordes francos</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Abundante</li><li>• Fuerte β hemólisis en los bordes difusos</li></ul>
Brachyspira innocens	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Abundante</li><li>○ Débil β hemólisis</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Abundante</li><li>• Débil β hemólisis</li></ul>

Estos resultados confirman que efectivamente 37 y 42 °C son las temperaturas óptimas para *S. hyodisenteriae* y *S. innocens*. Para la última no se observó diferencias en la intensidad de la hemólisis. Sin embargo esta fue más intensa a 37 °C para el caso de *S. hyodisenteriae*.

Por lo tanto la temperatura que adoptamos fue la de 37 °C para la estación de anaerobiosis.

3. **Periodo de crecimiento:** no se conocía el tiempo real de crecimiento de las distintas especies de Brachyspira. Nosotros realizamos un seguimiento durante 4 días de cada una de las especies. Los resultados fueron los siguientes:

	Brachyspira hyodisenteriae	Brachyspira innocens	Brachyspira pilosicoli
24 h después	Presencia (++)	Ausencia de crecimiento	
48 h después	Presencia (+++)	Presencia (++)	Presencia (++)
72 h después	Presencia (+++)	Presencia (++)	Presencia (++)
96 h después	Presencia (+++)	Presencia (+++)	Presencia (+++)

4. (++) Abundante
5. (+++) Muy abundante
6. **Conclusión:** en todas las siembras que realizamos observamos siempre el mismo efecto: se observa crecimiento de *S. hyodisenteriae* a las 24 horas de su siembra, mientras que *S. pilosicoli* y *S. innocens* no lo hacen hasta pasadas 48 horas. Este carácter no ha sido publicado hasta el momento y permite diferenciar de un modo objetivo *S. hyodisenteriae*. Este carácter se debe tener aún más en cuenta que la hemólisis, descrita hasta ahora como un método fiable de diferenciación entre *S. hyodisenteriae* y el resto de *Brachyspiras*. La hemólisis en algunos casos es relativa y no permite diferenciar siempre las bacterias que estudiamos.
7. **Sistemas de identificación bioquímico.**

Siempre utilizamos cepas de referencia en nuestros test bioquímicos facilitadas por la Dr. Gill R. Thomas del SAC Veterinary Service Laboratory, Escocia.

Testamos dos tipos de baterías estandarizadas y comercializadas: ID32A y Api Zym. En estas baterías se utilizan muchos tipos de reactivos que no aportan una diferenciación clara y no aparecen todos los caracteres esenciales. La problemática encontrada en estos dos tipos de galerías enzimáticas fue siguiente:

- ID32D: en los pocillos donde el reactivo Fast Blu (para el test de la fosfatasa alcalina y los aminoácidos) era añadido las coloraciones no eran nítidas, impidiendo así un diagnóstico claro y objetivo. Este problema fue resuelto utilizando un reactivo resguardado completamente de la influencia de la luz. Por otra parte este test carece de los test  $\alpha$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucosidasa, que son muy importantes para la diferenciación entre las distintas especies.
- Api Zym: esta batería de indentificación presenta el problema de carecer de los test indol e hipurato que son necesarios para la indentificación de *S. hyodisenteriae*.

En vista de los resultados obtenidos nos hemos visto forzados a poner a punto una batería de indentificación que constase de los siguientes elementos: indol, hipurato,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucosidasa.

0. Test Indol: búsqueda del indol proveniente de la degradación del triptofano por la triptofanasa con liberación de amoníaco y de ácido pirúvico. Podemos realizar dos tipos de test mediante "Diagnostic Tablets" de EUROBIO.

1.a Test Indol/TDA: se realiza una suspensión densa de *Brachyspira spp.* En 0,25 ml de suero fisiológico y una cápsula de "Diagnostic Tablets" debe ser añadida. Se realiza una incubación a 37 °C durante 4 horas. A continuación se añaden 3 gotas de reactivo de James. Al cabo de 3 minutos, una coloración roja aparecerá cuando exista producción de Indol.

1.b Test "Indol Spot": el cultivo de las bacterias debe ser realizado en un medio que contenga triptófano o triptona, como es el caso para el Agar Sangre *Brachyspira*. En un tubo de ensayo se aplastará una cápsula de "Diagnostic Tablets" y se añadirá 3-4 gotas de HCl 2 N. Esta mezcla se agitará durante 30 segundos y su contenido se depositará sobre un papel filtro sobre el que se añadirá un escobillón con la muestra bacteriana a testar. El positivo se confirma con un viraje a color azul.

En estos dos tipos de test obtenemos los siguientes resultados:

	TDA/Indol		Indol Spot	
Brachyspira hyodysenteriae	+	Rojo	+	Azul
Brachyspira innocens	-	Amarillo	-	Blanco
Brachyspira pilosicoli	-	Amarillo	-	Blanco

1. El test hipurato: capacidad para hidrolizar mediante la hipurato hidrolasa el hipurato en ácido benzoico y en glicina. Esta última se pone en evidencia en el test por la adición de una solución de ninhidrina.

Para la realización de este test hay que realizar una solución de hipurato de sodio a 50 mg/ml, concentración que corresponde a la saturación de este compuesto en el agua destilada.

Por otra parte realizamos una prueba con una cápsula de Diagnostic Tablets que diluimos con 0,25 ml de suero fisiológico y una muestra de las colonias a testar. La mezcla se incubó a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente se añadieron 5 gotas de solución ninhidrina a 3,5 % y el tubo fue nuevamente incubado a 37 °C durante 10-15 minutos.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	Solución con 50 mg/ml de hipurato de sodio	Diagnostic Tablets
Brachyspira hyodysenteriae	-	-
Brachyspira innocens	-	+
Brachyspira pilosicoli	+	+

Por lo tanto los dos métodos son válidos y permiten diferenciar *S. pilosicoli* de las otras dos testadas. Si podemos decir que el segundo tipo de test facilita enormemente el trabajo del técnico de laboratorio.

2. Test  $\alpha$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucosidasa: para cada test, una suspensión densa de cultivo bacteriano debe ser preparada en 0,25 ml de suero fisiológico con una cápsula de glucosidasa y ser incubado el conjunto a 37 °C durante 4 horas. El desarrollo de una coloración amarillenta en el sobrenadante indica la liberación de nitrofenol, signo de una reacción positiva.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

	$\alpha$ - galactosidasa	$\alpha$ - glucosidasa	$\beta$ - glucosidasa
Brachyspira hyodysenteriae	+	+	-
Brachyspira innocens	+	+	+
Brachyspira pilosicoli	-	-	+

**Conclusión sobre los test bioquímicos realizados sobre *Brachyspira spp.*:** estos 5 test realizados con las cápsulas de "diagnostic Tablets" son perfectamente fiables para la investigación de *Brachyspira spp.* Ellos pueden ser utilizados para establecer una batería bioquímica en pocillos.

3. **Test de conservación en frío:** realizamos dos tipos de pruebas para saber cual era el método de conservación más adecuado. Los dos test utilizados fueron:

f.1 Micro-bolitas: estas son capaces de resistir muy bajas temperaturas y su porosidad permite la adherencia de bacterias. Se utiliza una solución crioprotectora sobre la que se siembra un escobillón contaminado. Después de proceder a una agitación se absorbe el resto de solución mediante una pipeta Pasteur. Las micro bolitas fueron congeladas a -20 °C (desaconsejado por el suministrador) y a -70 °C. Posteriormente a la congelación y descongelación una de estas microbolitas es depositadas sobre ASS y una vez superpuesta la tapadera es agitada en todos los sentidos, consiguiendo así la siembra del cultivo. Posteriormente, se realiza un cultivo de la placa de Petri a 37 °C.

f.2 Leche descremada: actúa como solución crioprotectora puesto que puede ser congelada a bajas temperaturas y su composición permite aportar a las bacterias proteínas, vitaminas y otros constituyentes necesarios. Mediante una muestra de cultivo realizado sobre ASS, se realiza una solución en un tubo Eppendorf que se congela a -20 °C o a -70 °C. Posteriormente a su descongelación se realiza una siembra en ASS por el método lineal.

	Brachyspira hyodysenteriae			Brachyspira innocens		
	Microbolitas	Leche	Leche	Microbolitas	Leche	Leche
	-70 °C	-20 °C	-70 °C	-70 °C	-20 °C	-70 °C
Siembra 1	Algunos puntos de hemólisis	Cultivo abundante	Cultivo abundante	Algunos puntos de hemólisis	Cultivo abundante	Cultivo abundante
Siembra 2	Cultivo poco abundante	Cultivo abundante	Cultivo abundante	Sin crecimiento bacteriano apreciable	Cultivo poco abundante	Sin crecimiento bacteriano apreciable
Siembra 3	Desarrollo después de 72 horas	Cultivo abundante	Cultivo abundante	Sin crecimiento bacteriano apreciable	Crecimiento al cabo de 96 horas	Crecimiento al cabo de 72 horas, abundante a las 96 horas

Según estos resultados las microbolitas no son adecuadas para la conservación de *Brachyspira spp.*. Cabría la posibilidad de establecer dos hipótesis: o bien la solución crioprotectora no protege suficientemente a las bacterias contra el frío o bien no es un medio que permita la supervivencia de estas.

Sin embargo, los resultados obtenidos con la leche desnatada son satisfactorios. La leche es un buen crioprotector para *Brachyspira spp.*, obteniéndose mejores resultados a -70 °C que a -20 °C, debido a la mayor lentitud de congelación a -20 °C, originándose muy posiblemente en este caso una alteración de las membranas bacterianas. Por lo tanto aconsejamos la conservación de todas las especies de *Brachyspira* a -70 °C en leche descremada.

## 5.- RESULTADOS DE LOS ANALISIS REALIZADOS:

En el estudio realizado por **SANOFI SANTE NUTRITION ANIMALE** y el **LD Frank Duncombe**, podemos apreciar una mayoritaria implicación de *E. coli* hemolítico en las muestras tomadas. Su implicación es del 64,5 % de los casos. Este es el primer agente patógeno implicado en la aparición de diarreas grises o inespecíficas. Por otra parte el antígeno k -88 fue determinado en 14 casos sobre 49 detecciones de *E. coli* hemolítico, es decir un 28,6 % de estos casos.

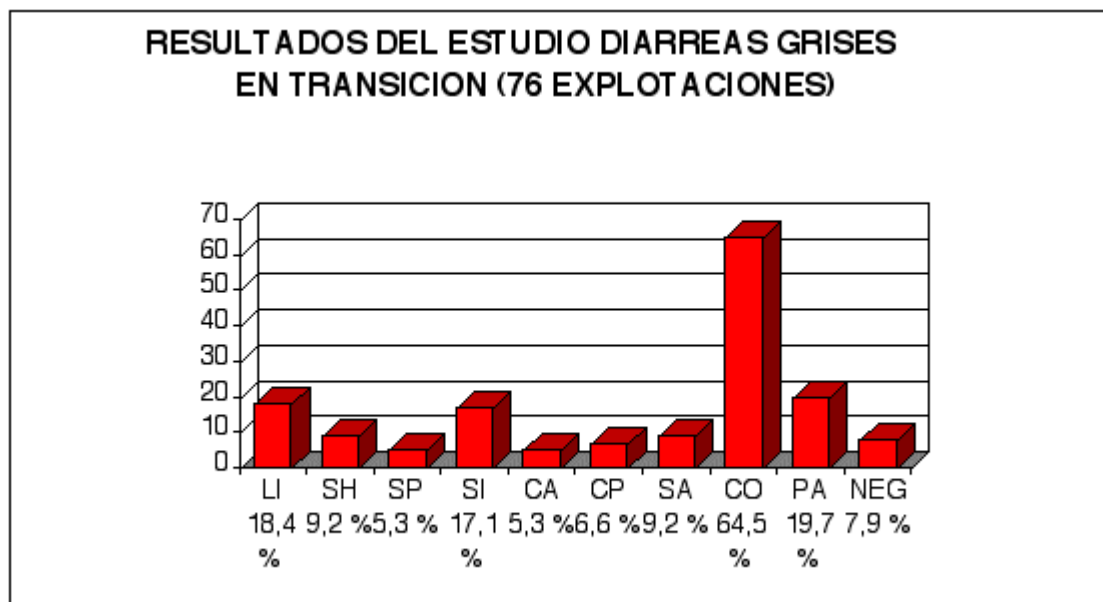
Hasta ahora en Francia la Ileititis hemorrágica así como los problemas originados por *Brachyspira hyodysenteriae* o *Brachyspira pilosicoli* se consideraban inexistentes o minoritarios. Queda mediante este estudio demostrada la importancia de estas enfermedades, destacando la importancia de *Lawsonia intracellularis* (18,4 %) como segundo agente patógeno en la patología de digestiva de origen bacteriano. Cabe destacar la importancia del genero *Brachyspira*, con una incidencia de 9,2 %, 5,3 % y 17,1 % respectivamente para *S. hyodysenteriae*, *S. pilosicoli* y *S. innocens*.

Por otra parte encontramos tan sólo un 9,2 % y un 6,6 % respectivamente para *Salmonella* spp. Y *Clostridium perfringens*. Las especies de Salmonela encontradas fueron las siguientes: *S. bredeney*, *S. enterica* y *S. tiphimurium*.

Cabe citar la aparición de *Campylobacter* spp. Implicado en un 5,3 % de los casos estudiados. No determinamos la especie de Campilobacteria, pero podemos decir que teniendo en cuenta que en otros estudios publicados sólo una pequeña proporción corresponde a *C. mucosalis* y *C. hyointestinalis*, principales patógenos de este género, se puede llegar a pensar que su incidencia real en la patología digestiva es mínima.

Por último cabe citar que en el 19,7 % de los casos se detectaron parásitos intestinales. Sobre estos 15 casos:

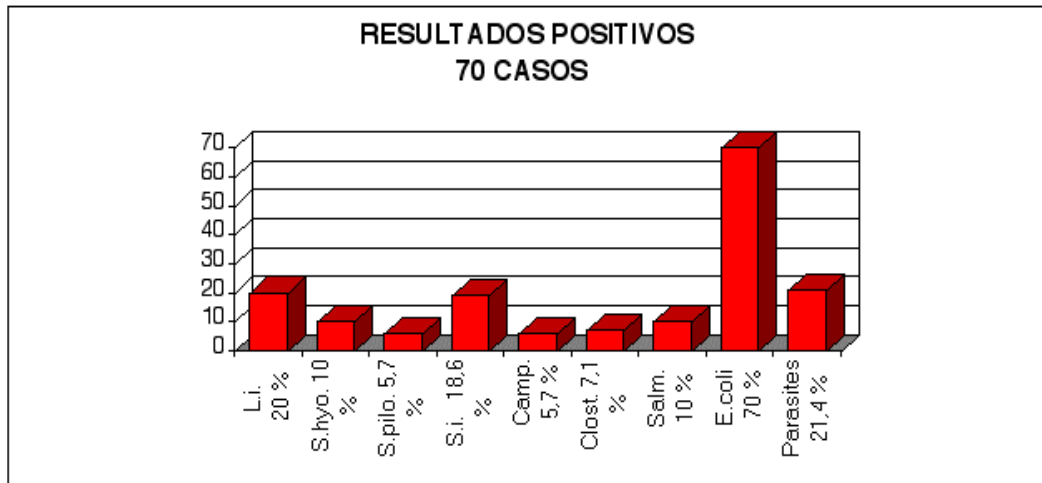
- 1 correspondía a 2 *Balantidium coli*/g de heces aislados,
- 1 correspondía a menos de 50 huevos/g de heces de *Trichuris suis*,
- 13 correspondían a ooquistes de coccidios. De ellos, sólo en 4 casos había más de 400 ooquistes/g heces, siendo la tasa mayor de infestación de 3.200 ooquistes g/heces. Cabe pensar que estas tasas de infestación no son causa mayor de la patología presentada, si bien no existe una relación directa entre en n° de ooquistes y los síntomas digestivos existentes.



a.

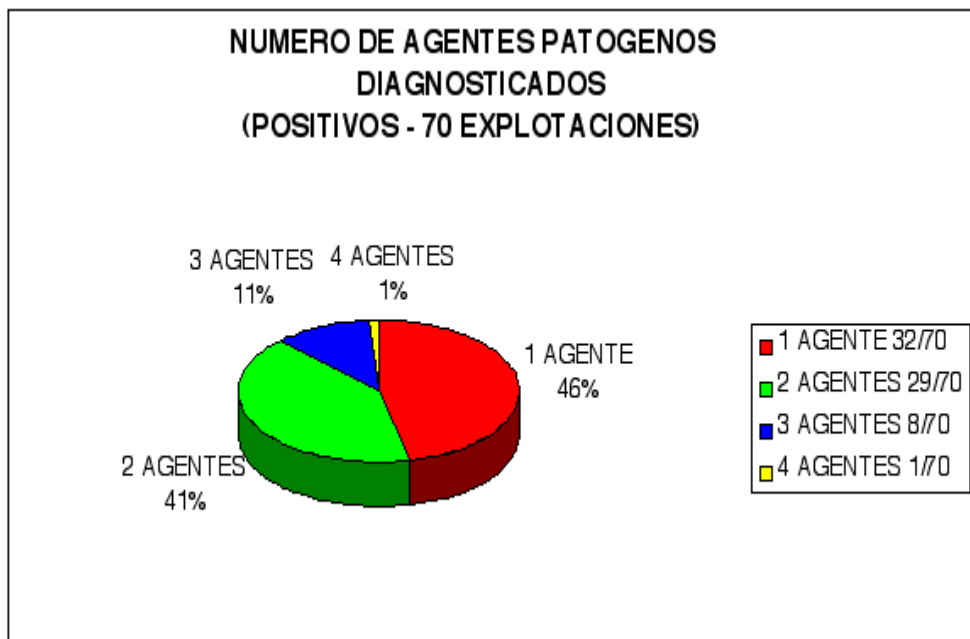
Gráfica nº 1. LI. *Lawsonia intracellularis* / SH. *Brachyspira hyodysenteriae* / SP. *Brachyspira pilosicoli* / SI. *Brachyspira innocens* / CA. *Campylobacter* spp. / CP. *Clostridium perfringens* / SA. *Salmonella* spp. / CO. *E. coli* hemolítico. / PA. Parásitos / NEG. Negativos

Si analizásemos únicamente los casos en los que detectamos algún agente patógeno y descartásemos los casos negativos, obtendríamos la siguiente gráfica (nº 2):



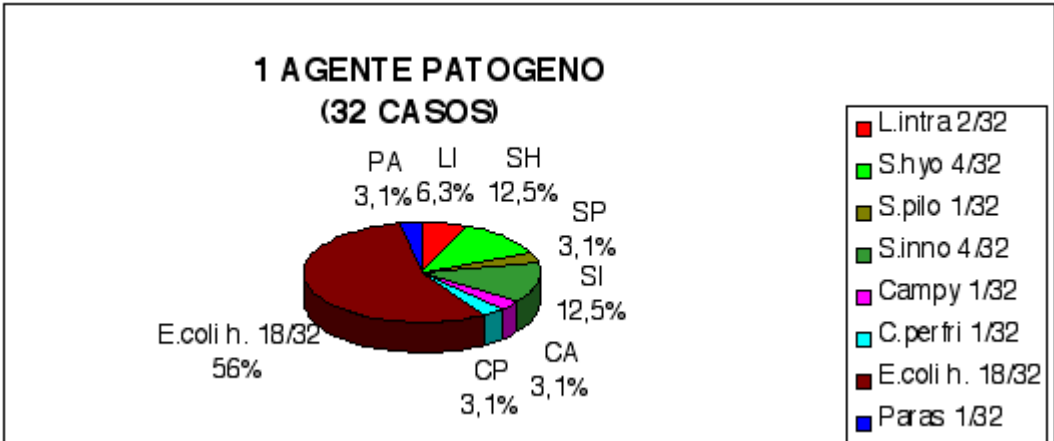
Gráfica n° 2.

Entre los diferentes casos aparecen tan sólo 32, en los que aparece un único agente considerado como patógeno, 29 casos en los que aparecen implicados 2 agentes patógenos, 8 casos en los que aparece implicados 3 agentes patógenos y un único caso en el que había 4 agentes patógenos. Esto queda representado en la gráfica n° 3.

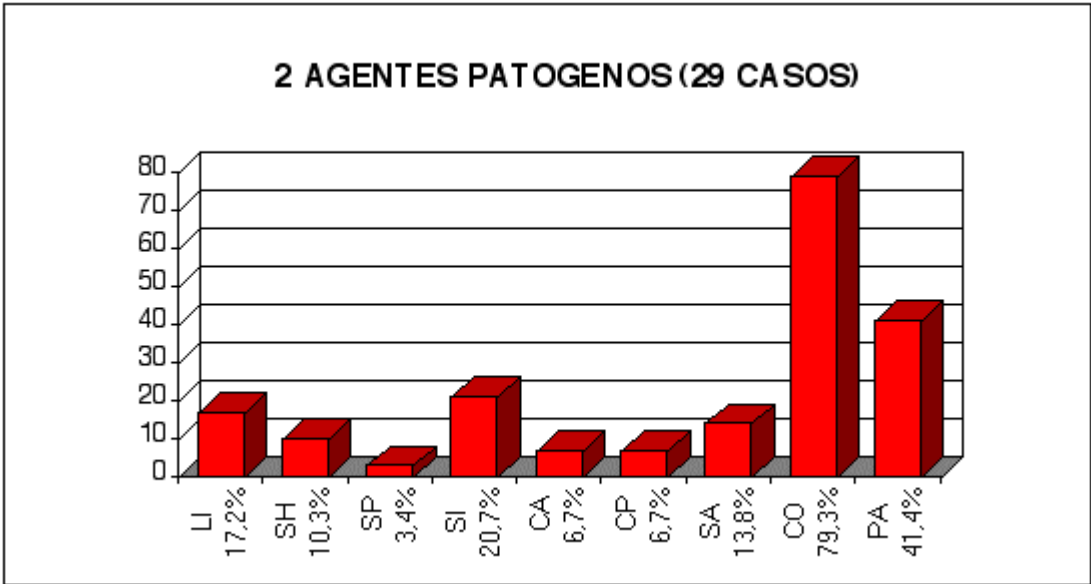


Gráfica n° 3.

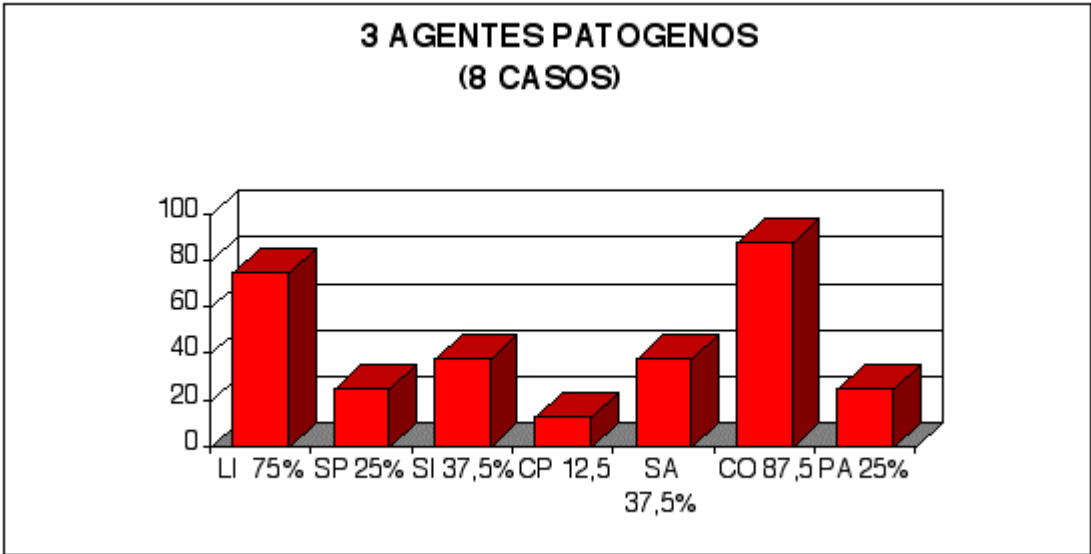
En cuanto a la distribución de los patógenos en cada una de las situaciones, podremos apreciar los resultados en las gráficas n° 4, 5 y 6. En el caso en el que se diagnosticaron 4 agentes patógenos, se encontraron implicados: *L. Intracellularis*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium perfringens* y *E. coli* hemolítico.



Gráfica nº 4.



Gráfica nº 5



## 6. DISCUSIÓN

### 1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Hasta ahora se había dudado en Francia de la importancia de *S. hyodysenteriae* y no se había llegado a diagnosticar laboratorialmente ningún caso de *S. pilosicoli*. Esto quizá venía dado por la dificultad de un diagnóstico práctico, rápido y en parte a que nadie hasta el momento había utilizado una estación anaerobia en este país para el diagnóstico de *Brachyspiras*. Nosotros aplicamos en parte, técnicas conocidas gracias a la ayuda de LABOFARM y a publicaciones internacionales. Estas técnicas fueron notablemente mejoradas en cuanto a los test bioquímicos de análisis, obteniendo así una batería de pruebas sencilla.

Estas técnicas se utilizan en la actualidad por el laboratorio donde realizamos este estudio. Somos conscientes que la fiabilidad y rapidez de las técnicas bioquímicas no pueden compararse con la técnica PCR, existente para *Brachyspira spp.* en estos momentos en algunos países. Sin embargo, para muchos laboratorios que no disponen de un aparato de PCR, estamos poniendo en sus manos la información necesaria para realizar un diagnóstico que permitirá a muchos clínicos de campo obtener información con respecto a la patología existente en las explotaciones que visitan.

Por otra parte en el transcurso de este estudio hemos obtenido mucha información sobre el método PCR para el diagnóstico de *L. intracellularis*. Tanto en el Laboratorio Frank Duncombe, como en LABOFARM, estrechos colaboradores en el estudio, se continúa trabajando sobre esta técnica. Avances para dar una mayor rapidez al diagnóstico de esta bacteria, serán objeto de publicaciones próximamente.

Pensamos que la intensidad de la hemólisis originada no es un criterio objetivo de diferenciación entre *Brachyspiras*. En algunos casos la fuerte o débil hemólisis nos planteó dudas al respecto.

### 2. DISCUSION SOBRE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO SOBRE LAS DIARREAS GRISES

Una vez analizados los resultados, cabe pensar en el interés de la utilización de diversos agentes antibacterianos al mismo tiempo para permitirnos cubrir el espectro más amplio posible. Únicamente, en un 32 % de los casos (45 sobre 70) encontramos implicado a un sólo agente patógeno.

La tasa de 20 % para *L. intracellularis* se aproxima a la publicada en otros países, siendo, no obstante algo inferior. En los análisis realizados con raspado de mucosa, la tasa se aproximaba al 30 %, pero en parte las muestras sobre las que realizamos estos análisis provenían del laboratorio departamental de Ploufragan, donde se realizaba una técnica de corte histológico. Ante muestras evidentes de adenomatosis intestinal y resultados negativos a la coloración argéntica, estas muestras eran conducidas a nuestro laboratorio. Pensamos sin embargo, que el mezclar 5 muestras de heces fue origen de falsos negativos. Actualmente se está mejorando la sensibilidad de la técnica, por lo que posiblemente el porcentaje de diagnóstico de la enfermedad sea sensiblemente superior.

## 7. CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES SOBRE LOS TEST BIOQUÍMICOS (sobre *Brachyspira spp.*)
8. Método de siembra: el más adecuado es el del bisturí.
9. Tipo de medio de cultivo: se debería utilizar preferentemente el medio descrito como Agar Sangre *Brachyspira*.
10. La atmósfera en la que obtuvimos los mejores crecimientos fue la anaerobia originada en una estación de anaerobiosis.
11. La temperatura más adecuada para el crecimiento de *Brachyspira spp.* es la de 37 °C.

12. *Brachyspira hyodysenteriae* crece a las 24 horas de su siembra, habiéndose observado hasta el momento este carácter. La velocidad de crecimiento parece ser un medio de diferenciar a *S. hyodysenteriae* de *S. pilosicoli* y *S. innocens*.
13. Para la diferenciación bioquímica los siguientes test han sido los que nos han dado mejores resultados a nivel de objetividad y rapidez en la obtención de resultados:
  - o Indol: Spot y TDA.
  - o Hipurato: hipurato de sodio y Diagnostic Tablets.
  - o Test  $\alpha$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucosidasa: Diagnostic Tablets.
3. El método de conservación en frío más adecuado entre los testados fue la leche desnatada a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
4. La hemólisis es un criterio subjetivo y no prioritario para el diagnóstico de *Brachyspira hyodysenteriae*.

## 7.2 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO SOBRE LAS DIARREAS GRISES.

5. Queda establecida como primer agente bacteriano y parasitario *E. coli* hemolítico con un 70 % de casos y *L. intracellularis* como segundo con un 20 % de casos para los casos en los que encontramos algún agente patógeno de los estudiados, teniendo en cuenta que *E. coli* no hemolítico no fue estudiado. La presencia de agentes parasitarios queda también demostrada, pero no nos atrevemos a juzgar su importancia en la patología digestiva.
6. En un segundo plano aparecen implicados *S. hyodysenteriae*, *S. pilosicoli*, *Clostridium perfringens* y *Salmonella spp.*. Dudamos de la importancia, a nivel de patología digestiva, en la incidencia de los casos de *Campylobacter spp.*. Las especies Salmonelas encontradas fueron: *S. bredeney*, *S. enterica* y *S. tiphimurium*.
7. Se debería tener en cuenta la posibilidad de más de un agente patógeno a la hora de enfocar un problema patológico digestivo.
8. Según las informaciones recogidas en publicaciones internacionales y la única aparición de *S. innocens* en algunos de los casos, se debería pensar en este agente a la hora de establecer un tratamiento en una explotación porcina en la que se haya diagnosticado.
9. Hemos diagnosticado por primera vez en Francia casos de *S. pilosicoli*, por lo que confirmamos su existencia en este país.

## 8. AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a SANOFI SANTE NUTRITION ANIMALE la financiación de este estudio y muy especialmente por su implicación y trabajo a todo el equipo de personas del Laboratorio Frank Duncombe.

También deseamos agradecer toda la información que nos facilitaron la Dra. Sionagh Smith y el Dr. Mc Orist, así como LABOFARM y su director el Dr. Jean Le Guennec, así como las cepas de referencia de *Brachyspira spp.* que nos fueron facilitadas por la Dr. Gill R. Thomson.

Agradecemos a la Facultad Veterinaria de Madrid y a la Escuela Veterinaria de Nantes el haber colaborado con nosotros.

Finalmente deseamos felicitar a todos los veterinarios y técnicos de las cooperativas y consultings porcinos que han participado en este estudio, sin cuya participación directa todo esto no habría sido posible: PSB, SELPAN, COOPAGRI, SEPMA, COOP. DE DYNAL, COOP. DE ST. YVI, CV del Dr. Lemey, PORFIMAD, PBO, TELDIS, CANA, BOCAVENT, CV del Dr. Pin, SCEPP, GUYOMARC'H, GPPM, SONAP, ARCO, VALPORC, LA PAYSANNE, OREPA, CEB, COFIPORC, COREAL, COOPERL, VETAN y FIPSO ELEVAGE.

## 1. BIBLIOGRAFIA

- o **HAMPSON D.J., STANTON T. B.** *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*, Edición CAB INTERNATIONAL, New York 1997.
- o **BESLIN F.** *Les entérites liées à des bactéries anaérobies chez le porcelet en post-sevrage. Intérêt de la supplémentation en Tiamuline.* Tesis doctoral ENVT, 1997.
- o **EUZEBY J. P.** *Infection à Brachyspira chez le porc.* UCAAB, Paris, 1997.
- o **EUZEBY J. P.** *L'étiologie des entérites prolifératives du porc.* Rev. Med. Vet., 1995, 623-630.
- o **MC ORIST; LAWSON G. H. K.** *L'enteropathie porcine proliférative.* Rec. Med. Vet. 1993, 697-702.
- o **MC ORIST; LAWSON G. H. K.** *PCR for diagnosis of porcine proliferative enteropathy.* Vet. Microbiology. 1994, 205-212.
- o **TAYLOR.** *Les diarrhees grises en post-sevrage et en debut d'engraissement.*
- o *La Enteropatía Proliferativa Porcina.* PORC1, 1996.

(1) *Rambla del Celler n° 133, 1º. 08190 Sant Cugat del Vallés (Barcelona) (España)*; (2) **SANOFI SANTE NUTRITION ANIMALE**, *ZI La Ballastière, BP 126 — 33501 Libourne CEDEX (Francia)*; (3) **Laboratoire Departamentale FRANK DUNCOMBE**, *1, route de Rosel — Saint Contest 14053 CAEN CEDEX (Francia)*.