



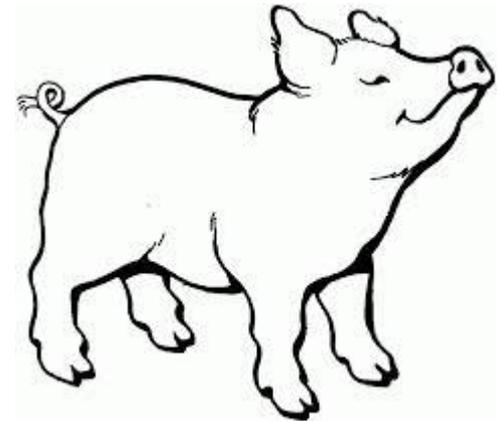
Diagnóstico laboratorial de Colibacilosis porcina y elaboración de Autovacunas

Dra. Gema Chacón

Dra. Ana Fernández

Cuadros clínicos

- **Diarrea neonatal**
- **Diarrea postdestete**
- **Enfermedad de los edemas**
- **Mastitis metritis agalaxia**
- **Infecciones del tracto urinario**
- **Septicemias, poliserositis...**



Patotipos

- **EPEC:** Diarrea neonatal, diarrea postdestete
- **STEC:** Enfermedad de los edemas
- **EPEC:** Diarrea postdestete
- **ExEC:** Septicemias, poliserositis



RETO DIAGNÓSTICO:

Escherichia coli forma parte de la flora normal del digestivo.

En animales sanos se aíslan cepas de *E. coli* virulentas.

(Schierack et al. 2006, Alustiza et al. 2012).

Casos de diarreas en los que no se detectan Fact. Virulencia.

(Osek et al. 1999, Zhang et al. 2007, Costa et al. 2010).



DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

¡IMPORTANTE!

- Anamnesis
- Muestreo significativo
- Diagnóstico diferencial
- Una única técnica diagnóstica no es definitiva



DIARRREAS NEONATALES

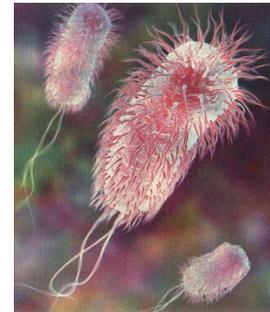
ETIOLOGÍA: ETEC, E. coli enterotoxigénico

➤ **Fimbrias:**

F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41

➤ **Toxinas:**

STa (toxina termoestable a)



DIARREAS NEONATALES

EPIDEMIOLOGÍA-CUADRO CLÍNICO:

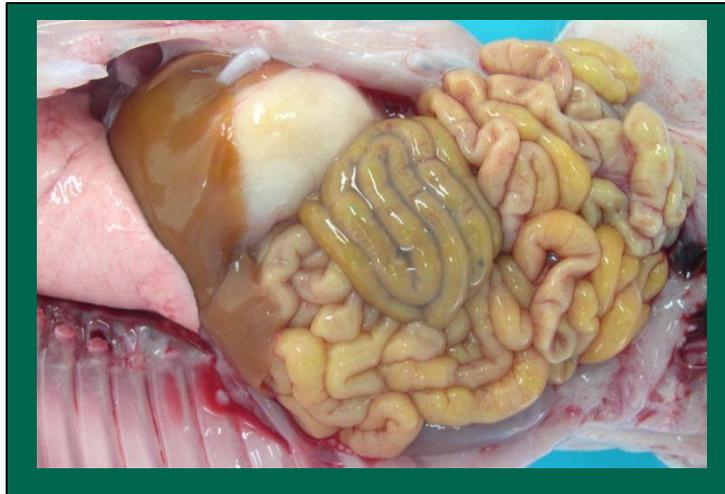
- **Diarreas a los 0-4 días de edad**
- **Camadas de primerizas principalmente**
- **Morbilidad variable; letalidad de hasta el 70%**
- **Diarreas amarillentas (de moderadas a acuosas)**
- **Deshidratación**



DIARRREAS NEONATALES

LESIONES MACROSCÓPICAS: poco específicas

- **Deshidratación**
- **Dilatación del estómago**
- **Congestión del intestino delgado, contenido amarillento**



LESIONES HISTOPATOLÓGICAS

- Adherencia de *E. coli* a las células epiteliales
- Enteritis catarral (neutrófilos, macrófagos)
- Congestión vascular
- Ausencia o escasa atrofia de vellosidades



DIARRREAS NEONATALES

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

➤ Clostridios:

Cl. perfringens

Cl. difficile

➤ Virus:

Coronavirus: TGE, PEDV

Rotavirus

➤ Coccidios:

Isospora suis



DIARRREAS NEONATALES

TOMA DE MUESTRAS:

► Seleccionar animales:

- *con diarrea característica del proceso instaurada
- *no tratados
- *sacrificados (no varias horas muertos)
- *de diferentes camadas

► Muestras:

- *paquetes intestinales completos
- *hisopos rectales y heces



DIARRREAS NEONATALES

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

➤ Cultivo microbiológico

Aislamiento y antibiograma

Diversidad de cepas de *E. coli*

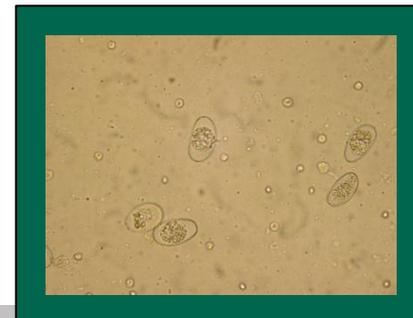
➤ Detección de factores de virulencia

➤ Tinciones: clostridios.

➤ PCR a tiempo real: rotavirus, (TGE y PEDV).

➤ Coprología: *Isospora suis*.

➤ Histopatología



DIARREAS NEONATALES. Caso 1

ANAMNESIS:

Aumento de bajas en maternidad

Lechones de menos de 24h con diarrea

Mayor incidencia en hembras primerizas

Sospecha clínica de colibacilosis

MUESTRAS:

5 lechones recién sacrificados



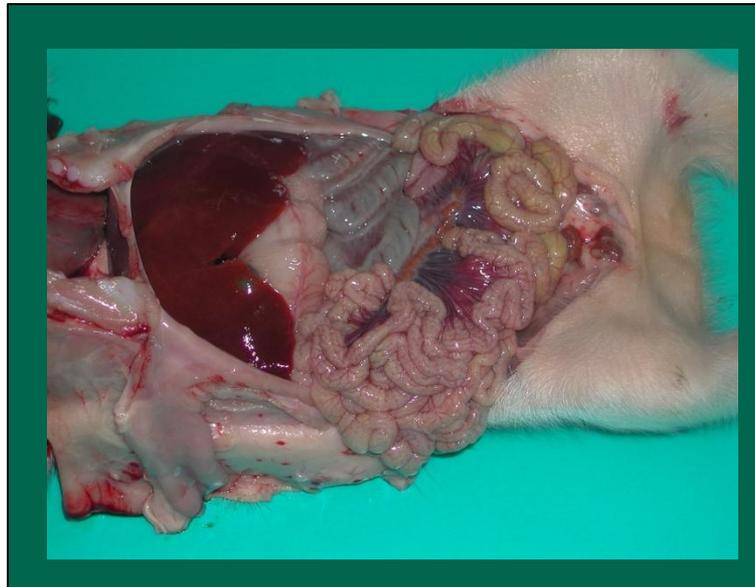
DIARREAS NEONATALES. Caso 1

NECROPSIA:

Intensa congestión del intestino delgado

Contenido muy fluido de color amarillento

Resto de órganos sin lesiones aparentes



MICROBIOLOGÍA

Cultivo microbiológico de Intestino Delgado:

Escherichia coli***

–Cultivo puro y masivo en todas las muestras

Diversidad de *E. coli*:

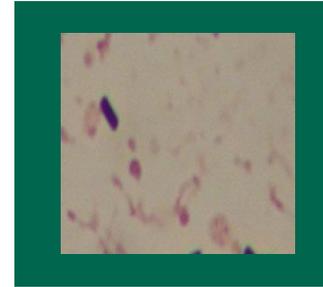
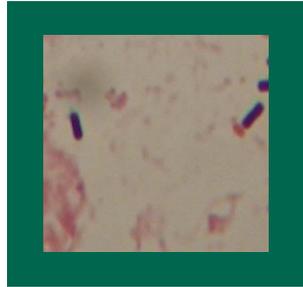
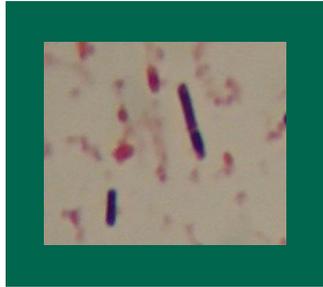
Una cepa mayoritaria

presente en 4 de las 5 muestras (67% de aisl.)



DIARRREAS NEONATALES. Caso 1

TINCIONES:



COPROLOGÍA:

Isospora suis negativo

qPCR:

Rotavirus negativo



DIAGNÓSTICO PROVISIONAL:

Colibacilosis

¿Posible implicación del *Cl. perfringens*?

OTRAS PRUEBAS A REALIZAR:

Detección de factores de virulencia:

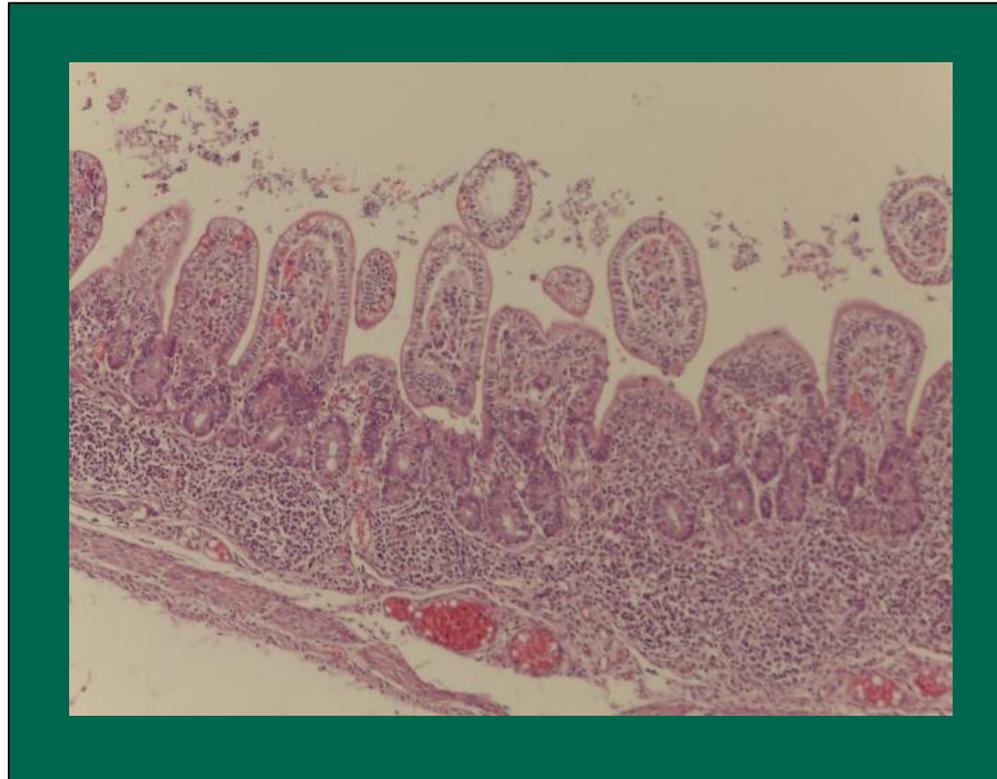
Negativo !!!

Histopatología



HISTOPATOLOGÍA:

Enteritis catarral asociada a E. coli



ANAMNESIS:

Diarreas neonatales (<1 día de vida)

Mortalidad de 20%

Principalmente en camadas de primerizas

No responden al tratamiento antibiótico

MUESTRAS:

4 lechones sin tratar de dos camadas diferentes



NECROPSIA:

Asas del intestino delgado muy congestivas.

Ciego repleto de contenido espeso amarillo claro.

Estómagos llenos de leche.



MICROBIOLOGÍA

Cultivo microbiológico:

Int. Delgado 1: *Escherichia coli****

Int. Delgado 2: *Escherichia coli***

Int. Delgado 3: *Escherichia coli**

Int. Delgado 4: *Escherichia coli**

Diversidad de *E. coli*:

Se encuentran **9 cepas diferentes**

No se observa ninguna cepa mayoritaria



TINCIONES:

Gram de improntas de l. delgado:

No se observan clostridios en ninguna de las muestras

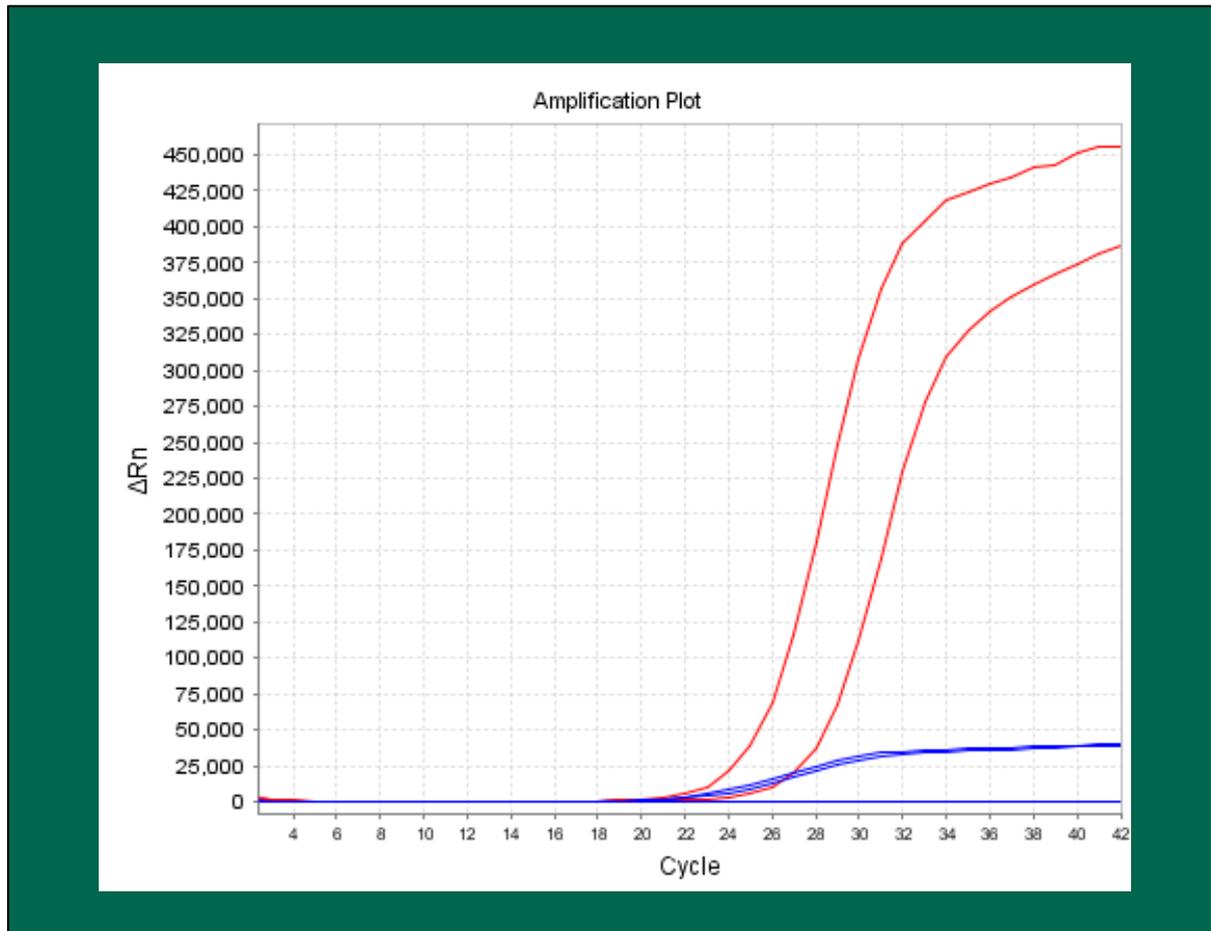
COPROLOGÍA:

***Isospora suis* negativo**



DIARRREAS NEONATALES. Caso 2

qPCR: Rotavirus positivo



Diagnóstico



DIAGNÓSTICO PROVISIONAL:
¿Rotavirus?

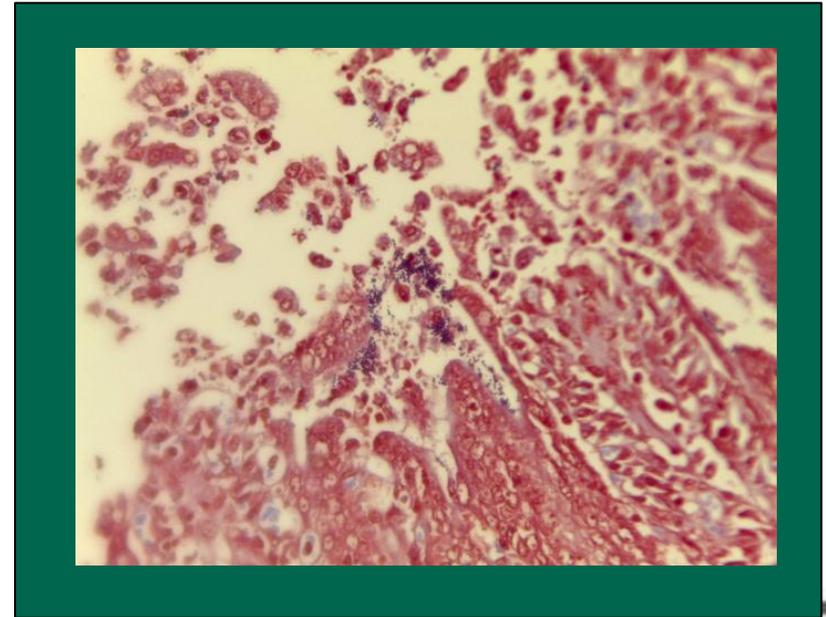
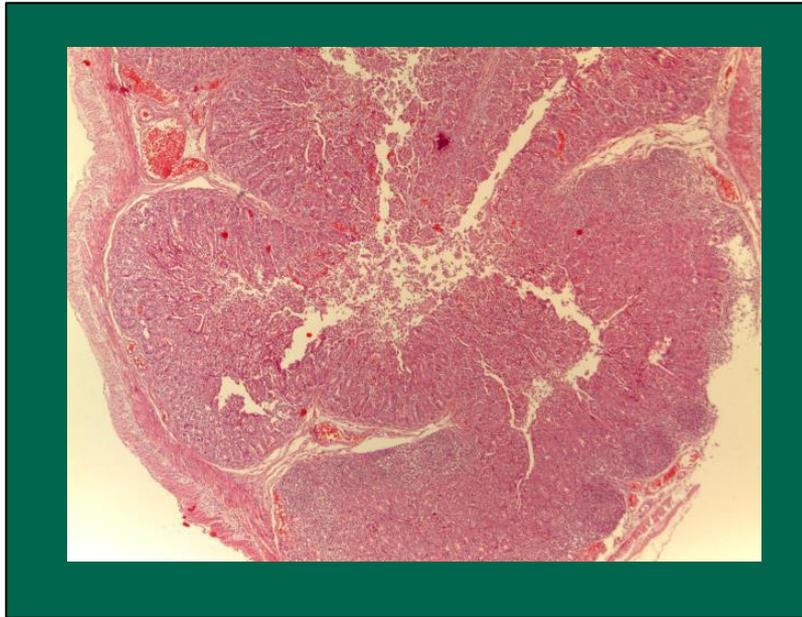
OTRAS PRUEBAS A REALIZAR:
Histopatología



HISTOPATOLOGÍA:

Enteritis catarral leve bacteriana

Compatible con Enterococo y E. coli.



No se observan lesiones asociadas a virus



DIARRREAS POSTDESTETE (PWD)

ETIOLOGÍA:

➤ ETEC, E. coli enterotoxigénico

Fimbrias: F4 (K88), F18

Toxinas: STa, STb, LT, (Stx2e, EAST-1)

➤ EPEC, E. coli enteropatógeno*

Adhesina no fimbrial: Intimina (gen EAE)

*Poco importante en porcino



DIARREAS POSTDESTETE (PWD)

EPIDEMIOLOGÍA:

- **Diarreas al destete (↓ Inmunidad maternal)**
- **También casos en cebo**
- **Morbilidad alta**
- **Mortalidad hasta el 25% (animales no tratados)**
- **Pueden aparecer en un brote PWD y ED**



DIARREAS POSTDESTETE (PWD)

CUADRO CLÍNICO:

- **Similar a diarreas neonatales (menos severas)**
- **Diarreas amarillentas-grisáceas**
(de moderadas a acuosas)
- **Deshidratación**
- **Disminución de ganancia de peso**



DIARREAS POSTDESTETE (PWD)

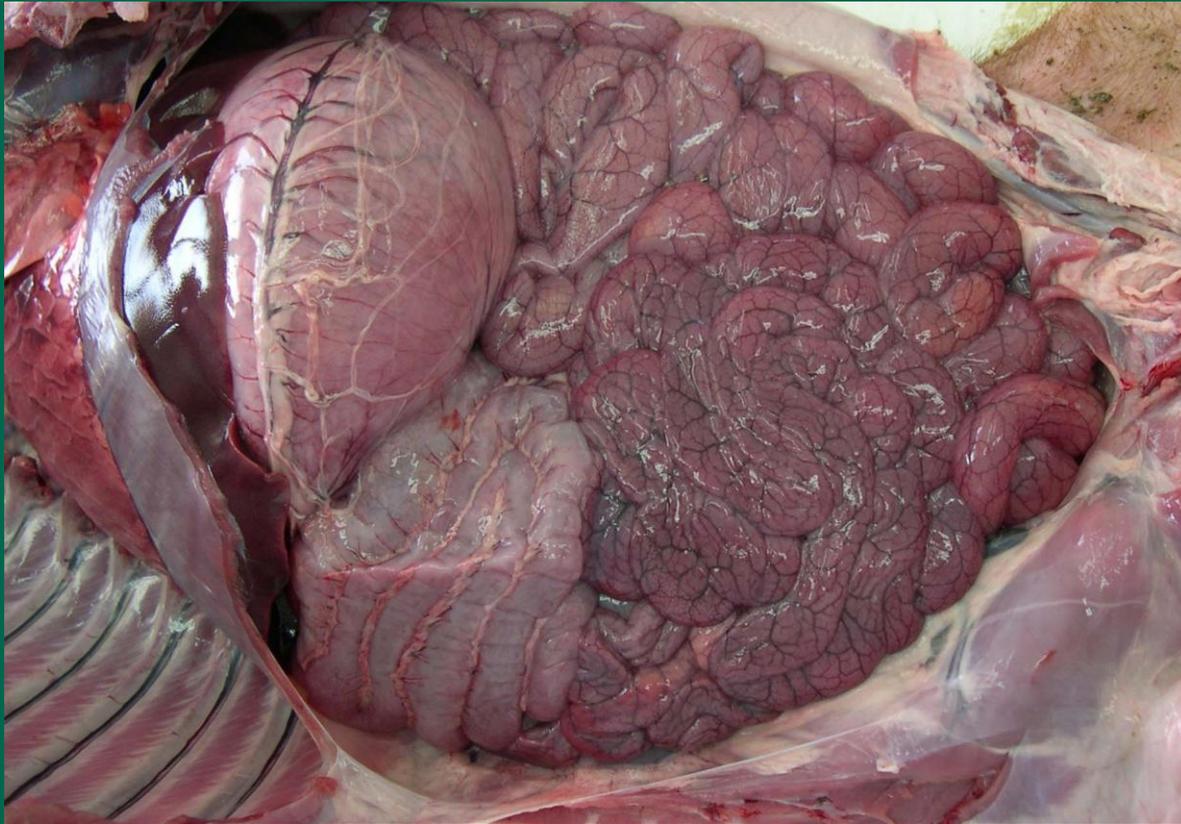
LESIONES MACROSCÓPICAS

- **Deshidratación**
- **Dilatación del estómago con comida seca**
- **Congestión del intestino delgado**
- **Intensa congestión del mesenterio**
- **Ocasionalmente úlceras en estómago
y/o l. grueso**



DIARRREAS POSTDESTETE (PWD)

LESIONES MACROSCÓPICAS



Diagnóstico



DIARRREAS POSTDESTETE (PWD)

LESIONES HISTOPATOLÓGICA

- Adherencia de E. coli a las células epiteliales
- Enteritis catarral (neutrófilos, macrófagos)
- Congestión vascular
- Ausencia o escasa atrofia de vellosidades



DIARRREAS POSTDESTETE (PWD)

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

➤ Bacterianas:

Salmonella

Lawsonia intracellularis

Brachyspira hyodysenteriae/pilosicoli

➤ Virus:

TGE, PEDV, Rotavirus

➤ Parásitos

➤ Causas no infecciosas:

nutricionales, intoxicaciones



DIARRREAS POSTDESTETE (PWD)

TOMA DE MUESTRAS:

➤ **Seleccionar animales:**

- *con diarrea característica del proceso instaurada
- *no tratados
- *sacrificados (no varias horas muertos)

➤ **Muestras:**

- *paquetes intestinales completos
- *hisopos rectales y heces



DIARREAS POSTDESTETE (PWD)

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

- ▶ **Cultivo microbiológico**
 - I. delgado e I. grueso
 - Comparación de E. coli
- ▶ **Tinciones: espiroquetas, clostridios**
- ▶ **PCR a tiempo real:**
 - Rotavirus (TGE, PEDV)
 - Lawsonia intracelularis*
 - Br. hyodisenteriae*, *Br. pilosicoli*
- ▶ **Coprología**



ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS

ETIOLOGÍA:

➤ **STEC: *E. coli* productor de Shigatoxina**

(VTEC: verotoxigénico)

Fimbrias: F18

Toxinas: Stx2e



Casi siempre asociado a *E. coli* β hemolítico



ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS

EPIDEMIOLOGÍA:

- **En torno al destete, también en cebadero**
- **Morbilidad: Desde casos esporádicos a casi el 100%**
- **Pueden aparecer en un brote PWD y ED**
- **Existen animales genéticamente resistentes:
(carecen de receptor de F18)**



ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS

PATOGENIA:

Colonización del I. Delgado por STEC (F18)



Producción de Sxt2e



Absorción de la Sxt2e a nivel sistémico



Daño a nivel de células endoteliales



EDEMA



ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS

CUADRO CLÍNICO:

- **Bajas súbitas sin síntomas previos**
- **Edema subcutáneo: parpados, cara.**
- **Síntomatología nerviosa:**
decúbito, incoordinación, pedaleo...
- **Otros: disnea, ausencia de diarrea y fiebre**



ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS

LESIONES MACROSCÓPICAS

Animales buena condición corporal

- **Edema (no siempre):**
subcutáneo, mesocolón, del cardias del estómago...
- **Nódulos linfáticos mesentéricos:**
aumentados de tamaño, congestivos y edematoso



ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS

LESIONES MACROSCÓPICAS



Diagnóstico



ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS

LESIONES HISTOPATOLÓGICAS

- **Adherencia de E. coli a las células epiteliales (yeyuno e íleon)**
- **Degeneración angiopática de arterias y arteriolas**
Poliencefalomalacia bilateral simétrica del tronco del encéfalo



ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

➤ Baja súbita:

Septicemia bacteriana: mal rojo, *Pasteurella multocida*...

➤ Síntomas nerviosos:

Bacterias: *Haemophilus parasuis*, *Strep. Suis*

Virus: Aujeszky

No infecciosas: intoxicación por sal

➤ Edemas:

Micotoxinas, enfermedad corazón de mora.



ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS

TOMA DE MUESTRAS:

➤ Seleccionar animales:

- *no tratados
- *sacrificados (no varias horas muertos)
- *animales con diferente periodo de evolución

➤ Muestras a remitir:

- *Lechones
- *Órganos: paquetes intestinales, encéfalo, pulmón, hígado, bazo...



ENFERMEDAD DE LOS EDEMAS

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

- **Cultivo microbiológico**

 - I. delgado e I. grueso

 - Encéfalo, pulmón, hígado, bazo...

- **Diversidad de cepas de E. coli**

- **Detección de factores de virulencia**

- **Histopatología**



ANAMNESIS:

Cerdo ibérico

Muerte súbitas en animales de cebo

Diarrea

Síntomas nerviosos

Edema parpebral

MUESTRAS:

Paquetes digestivos completos de 4 animales



NECROPSIA:

**Intestino delgado de los 4 animales:
intensa congestión**



NECROPSIA:

Animal 4:

edema de mesocolón



MICROBIOLOGÍA

Cultivo microbiológico de

I. Delgados e I. Gruesos

Escherichia coli β hemolitico***

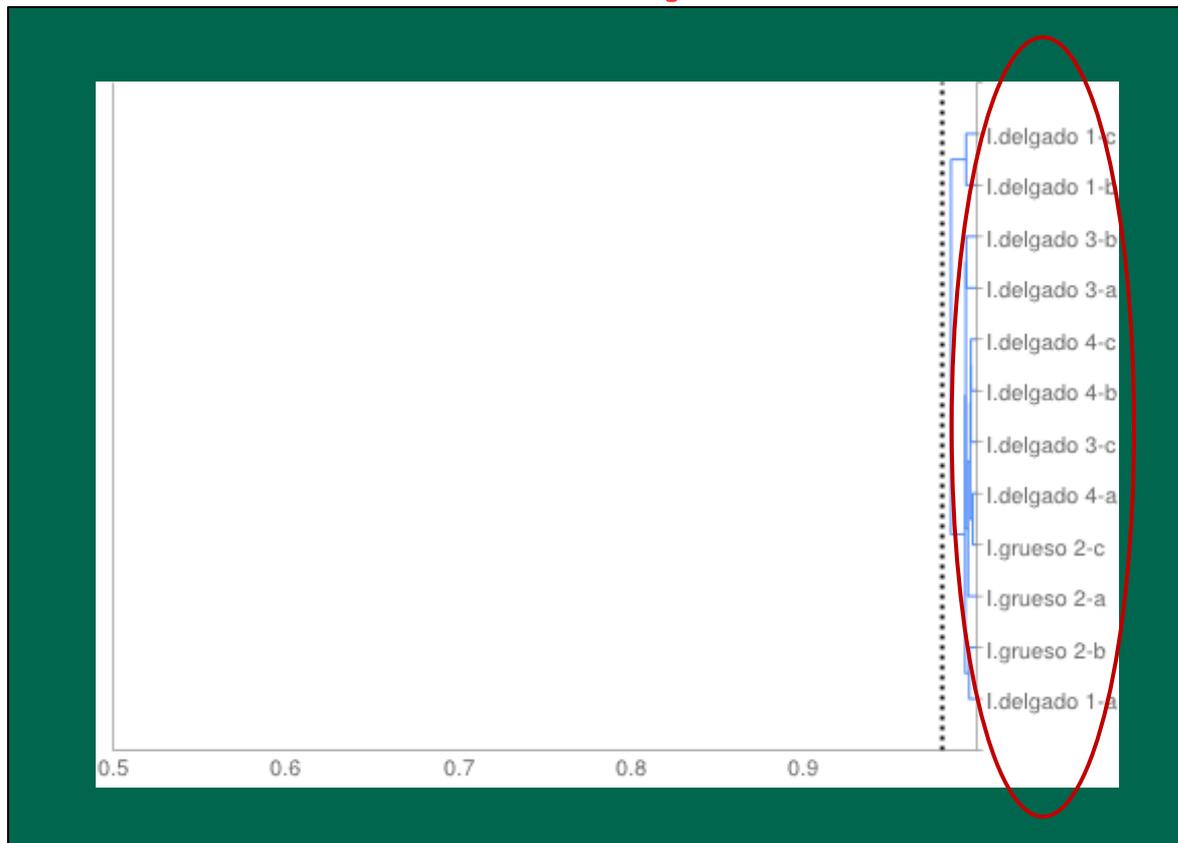
Cultivo puro y masivo en todas las muestras

No aislamiento de Salmonella sp.



COMPARACIÓN DE *E. coli*:

- Una única cepa



TINCIONES:

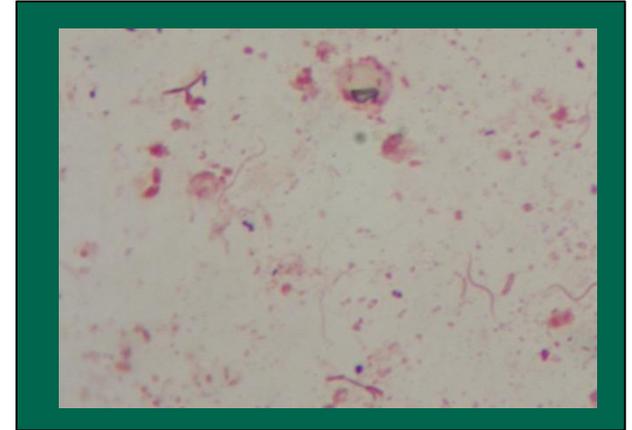
Gram de improntas de l. delgado:

Clostridios: negativo

Gram de improntas de l. grueso:

Clostridios: positivo*

Espiroquetas: positivo* en l. grueso 1 y 4



DIAGNÓSTICO PROVISIONAL:

Colibacilosis:

enfermedad de los edemas + PWD

¿¿Brachyspiras??

OTRAS TÉCNICAS A REALIZAR:

Cultivo de brachyspiras o PCR

Detección de factores de virulencia

Histopatología



OTRAS TÉCNICAS A REALIZAR:

Cultivo de brachyspiras:

*Brachyspira intermedia*** en l. grueso 1 y 4

Detección de factores de virulencia: NR

Histopatología: NR



ANAMNESIS:

Bajas en cebadero (14 semanas de vida)

Disnea

Síntomas nerviosos (incoordinación)

Edema parpebral en algunos animales

MUESTRAS:

1 animal recién sacrificado



NECROPSIA:

Edema parpebral

Ausencia de edema de mesocolón

Intestino delgado:

congestión y engrosamiento de la mucosa



MICROBIOLOGÍA

Pulmón: Enterobacterias*/*Staph. Coag. Neg**

Hígado: *E. coli* β hemolítico*

Bazo: *E. coli* β hemolítico*

Encéfalo: *E. coli* β hemolítico**

Pericardio: Sin crecimiento

Liq. Peritoneo: *Staph. Coag. Neg**

Int. Delgado: *E. coli* β hemolítico***

Int. Grueso: *E. coli* β hemolítico***

Una única cepa de *E. coli*



DIAGNÓSTICO PROVISIONAL:

Colibacilosis: enfermedad de los edemas.

OTRAS TÉCNICAS A REALIZAR:

Detección de factores de virulencia

Histopatología



DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA:

Fimbrias: F18 (gen *fedA* y *fedF*)

Toxinas: *Stx2e*

PATOTIPO: STEC

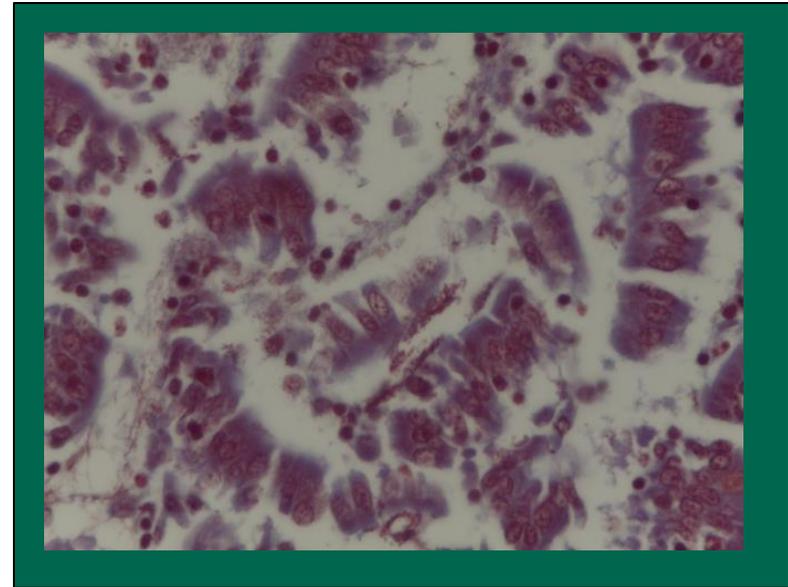
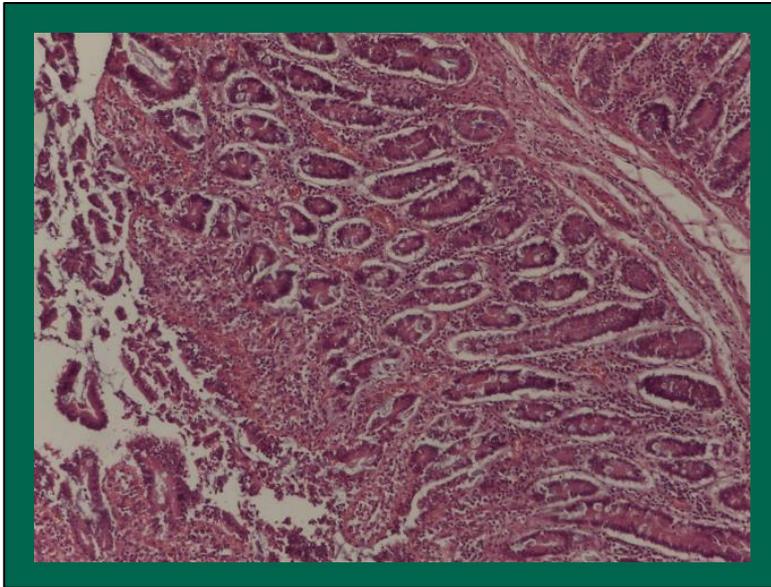
SEROTIPO: O139 H1



HISTOPATOLOGÍA:

Grave e intensa enteritis de origen bacteriano

Congestión de carácter moderado en pulmón y encéfalo



AUTOVACUNAS

- **Autovacuna:** vacuna elaborada con cepas de agentes patógenos aislados en una explotación destinada a inmunizar únicamente animales de dicha explotación

¿Cuándo utilizar una AUTOVACUNA
frente a *E. coli* en ganado porcino ?



AUTOVACUNAS

- ▶ ▶ ▶ La vacunación de madres es uno de los métodos más efectivos para la prevención de las diarreas neonatales por *E. coli*
- ▶ ▶ ▶ Los anticuerpos contenidos en el calostro materno inhiben la adherencia de *E. coli* a receptores intestinales y neutralizan la actividad de las toxinas

Prevención de la COLIBACILOSIS NEONATAL



AUTOVACUNAS

COLIBACILOSIS NEONATAL: F4(K88), F5(K99), F6(987P), F41

VACUNAS COMERCIALES

FACTOR	VAC1	VAC2	VAC3	VAC4	VAC5	VAC6
K88 (F4)	+	+	+	+	+	+
K99 (F5)	+	+	+	+	+	+
987P (F6)		+	+	+	+	+
F41					+	
F18					+	
LT		+	+		+	
STa					+	
VT (Stx)					+	
HlyI					+	



AUTOVACUNAS

- **Cepas de E. coli que portan factores de virulencia asociados a los distintos tipos de colibacilosis porcina se encuentran habitualmente entre los animales sanos**

(Schierack et al, 2006 Alustiza et al, 2012)

- **Cepas asociadas a colibacilosis neonatal negativas para F4, F5, F6, y F41**
(Kim et al., 2010)



Las AUTOVACUNAS son un complemento o una alternativa a las vacunas comerciales cuando estas no tienen el efecto deseado



AUTOVACUNAS

REQUISITOS NECESARIOS

- **Presencia de la patología en la explotación**
- **Diagnóstico previo confirmatorio de colibacilosis:**
 - *Selección de muestras**
 - *Diagnóstico diferencial completo**
- **ADECUADA SELECCIÓN DE CEPAS A INCLUIR**



AUTOVACUNAS

TIPIFICACIÓN BACTERIANA

La tipificación o tipado de una bacteria implica la caracterización de los aislamientos más allá de la identificación a nivel de especie y permite discriminar cepas pertenecientes a una misma especie bacteriana

En ganadería, la tipificación de aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de distintas muestras permite:

- Identificar cuántas cepas hay
- Comparar aislamientos



AUTOVACUNAS

▶▶▶ TIPIFICACIÓN GENOTÍPICA

- Perfiles plasmídicos
- Patrones de restricción de ADN por endonucleasas (PFGE, RFLP)
- Hibridación con sondas (Ribotipado)
- Basados en la PCR (RAPD, AP_PCR, AFLP, MLST, MLVA)

▶▶▶ TIPIFICACIÓN FENOTÍPICA

- Serotipificación
- Fagotipificación
- Antibiorresistencia
- **Perfil bioquímico**



AUTOVACUNAS

TIPIFICACIÓN SEGÚN EL PERFIL BIOQUIMICO

Se basa en la determinación de patrones bioquímicos mediante la medida cuantitativa de distintas reacciones bioquímicas

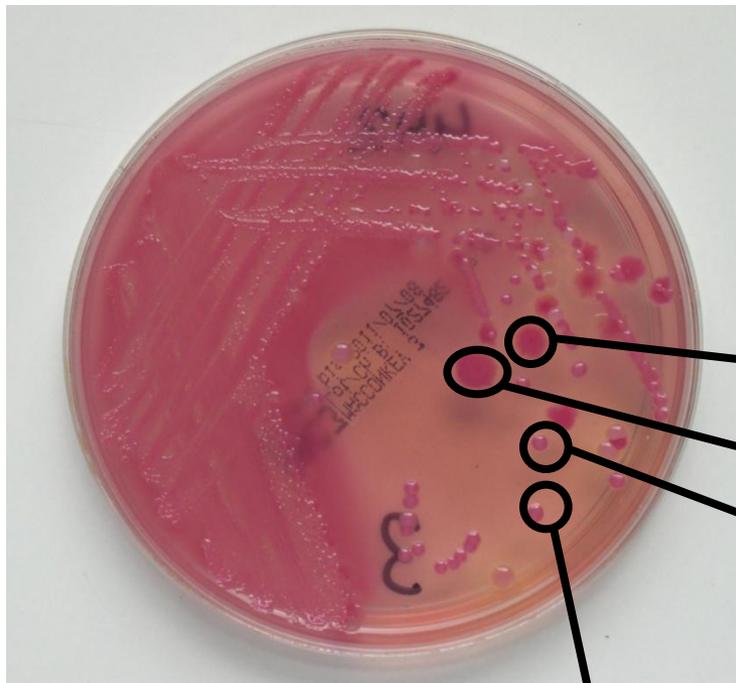
- ▶ Rápido
- ▶ Económicamente asumible
- ▶ Permite caracterizar gran número de aislamientos
- ▶ Altamente discriminatorio para *E. coli* (Katouli *et al.* (1995); Landgren *et al.* (2005); Ansaruzzaman *et al.* (2007); Reyes *et al.* (2009))



AUTOVACUNAS

METODOLOGIA

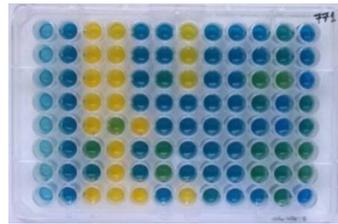
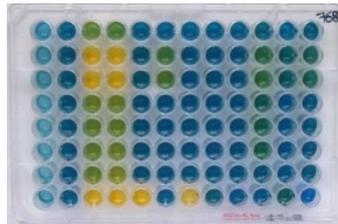
- Aislamiento bacteriológico
- Selección de varias colonias de *E. coli* por muestra y subcultivo



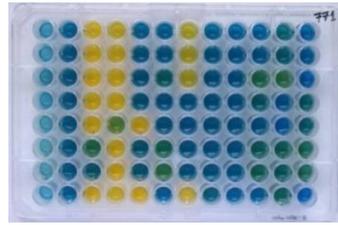
AUTOVACUNAS

METODOLOGIA

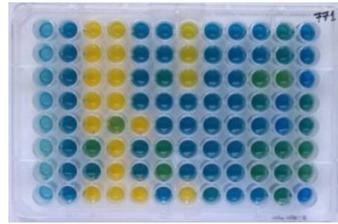
- Incubación y lectura



Lectura 1



Lectura 2



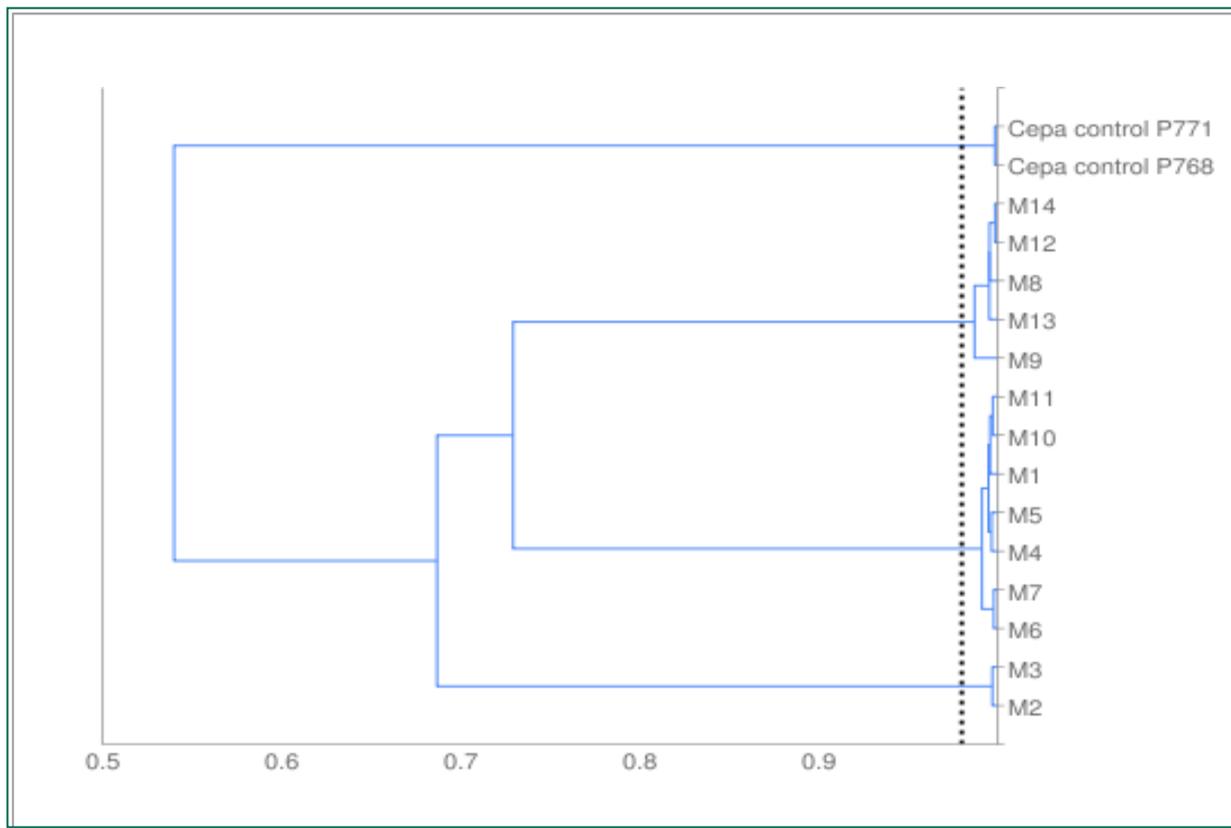
Lectura 3



AUTOVACUNAS

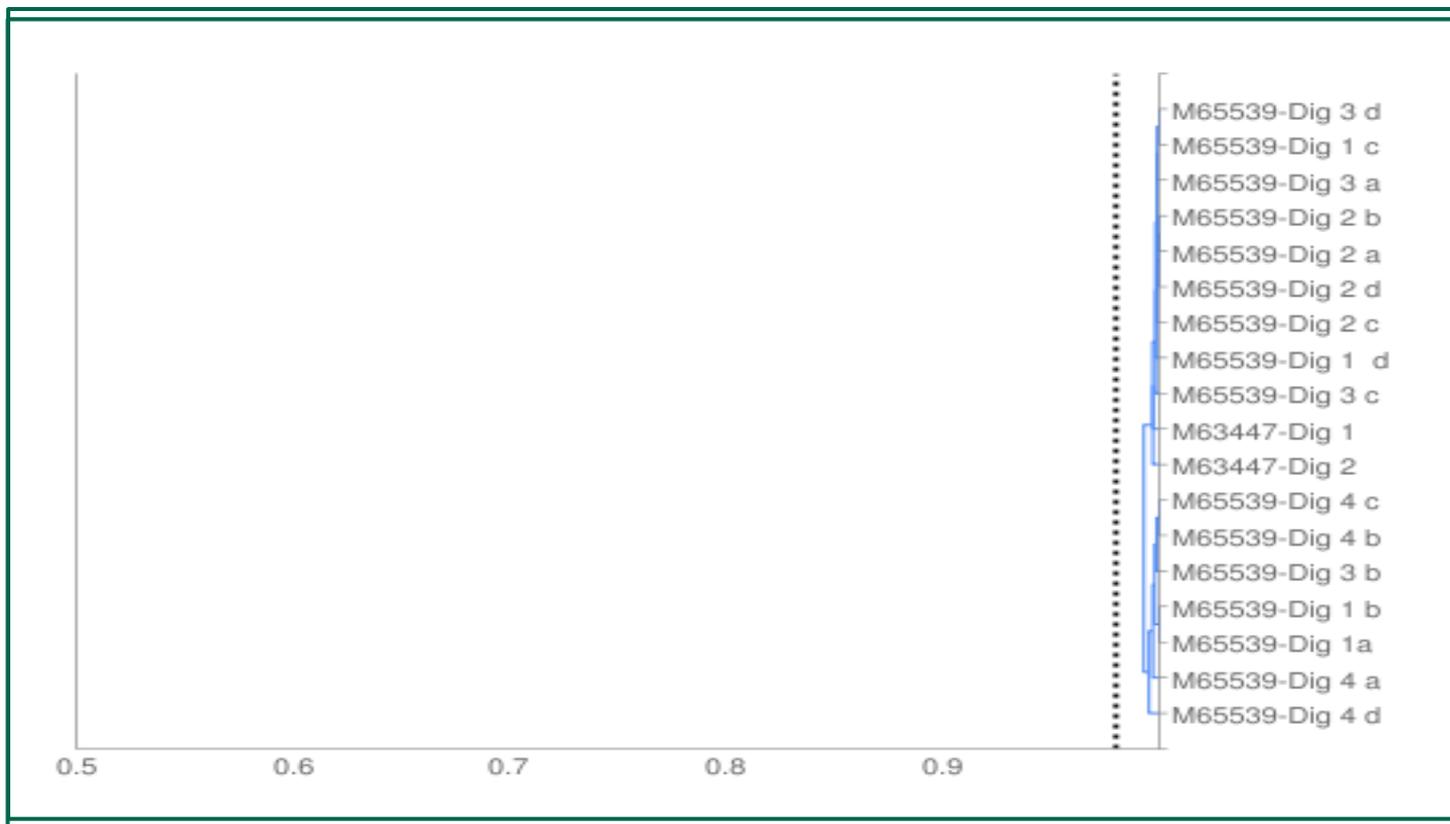
METODOLOGIA

- Elaboración de un dendograma



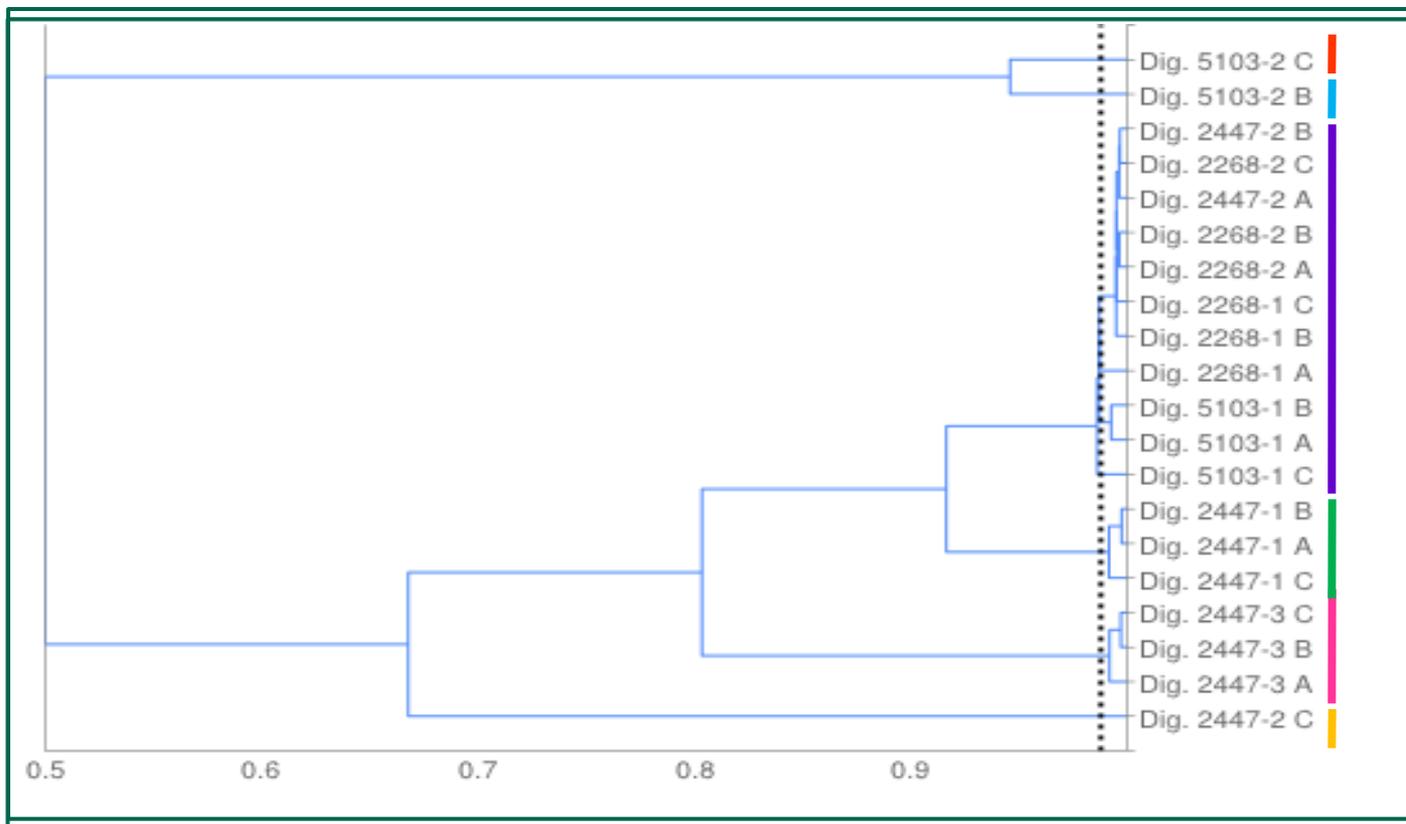
AUTOVACUNAS

COLIBACILOSIS NEONATAL



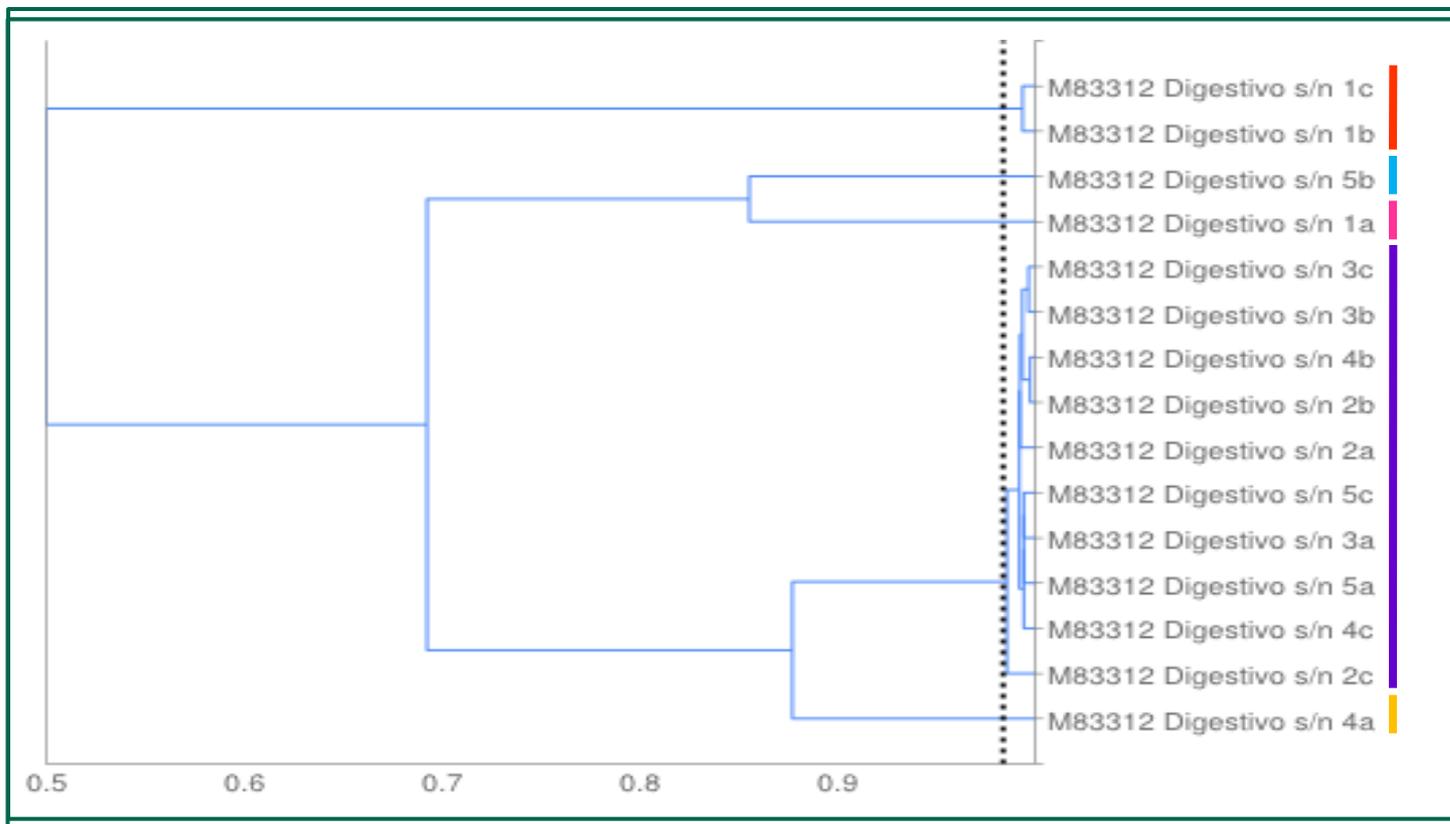
AUTOVACUNAS

COLIBACILOSIS NEONATAL



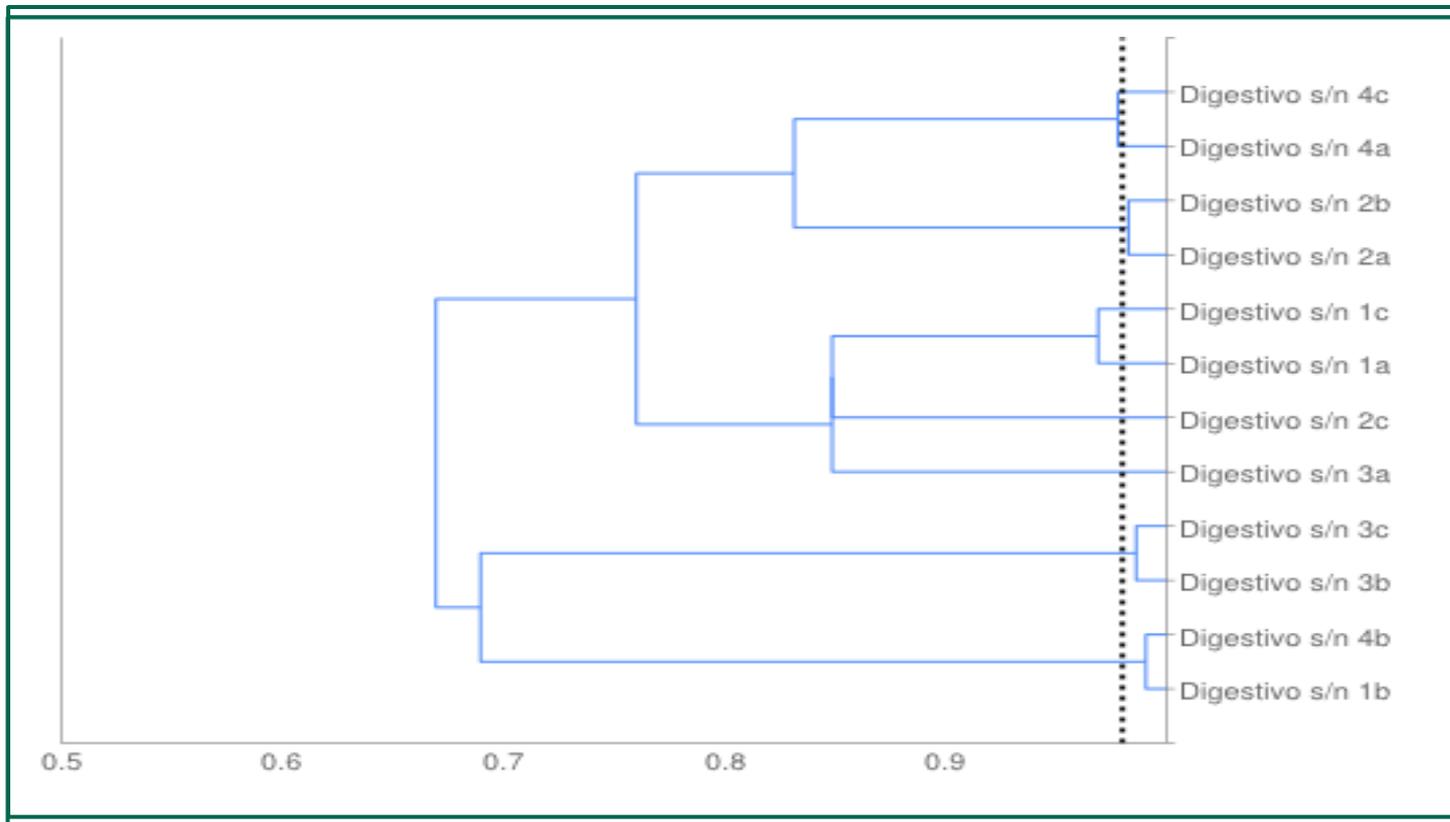
AUTOVACUNAS

COLIBACILOSIS NEONATAL



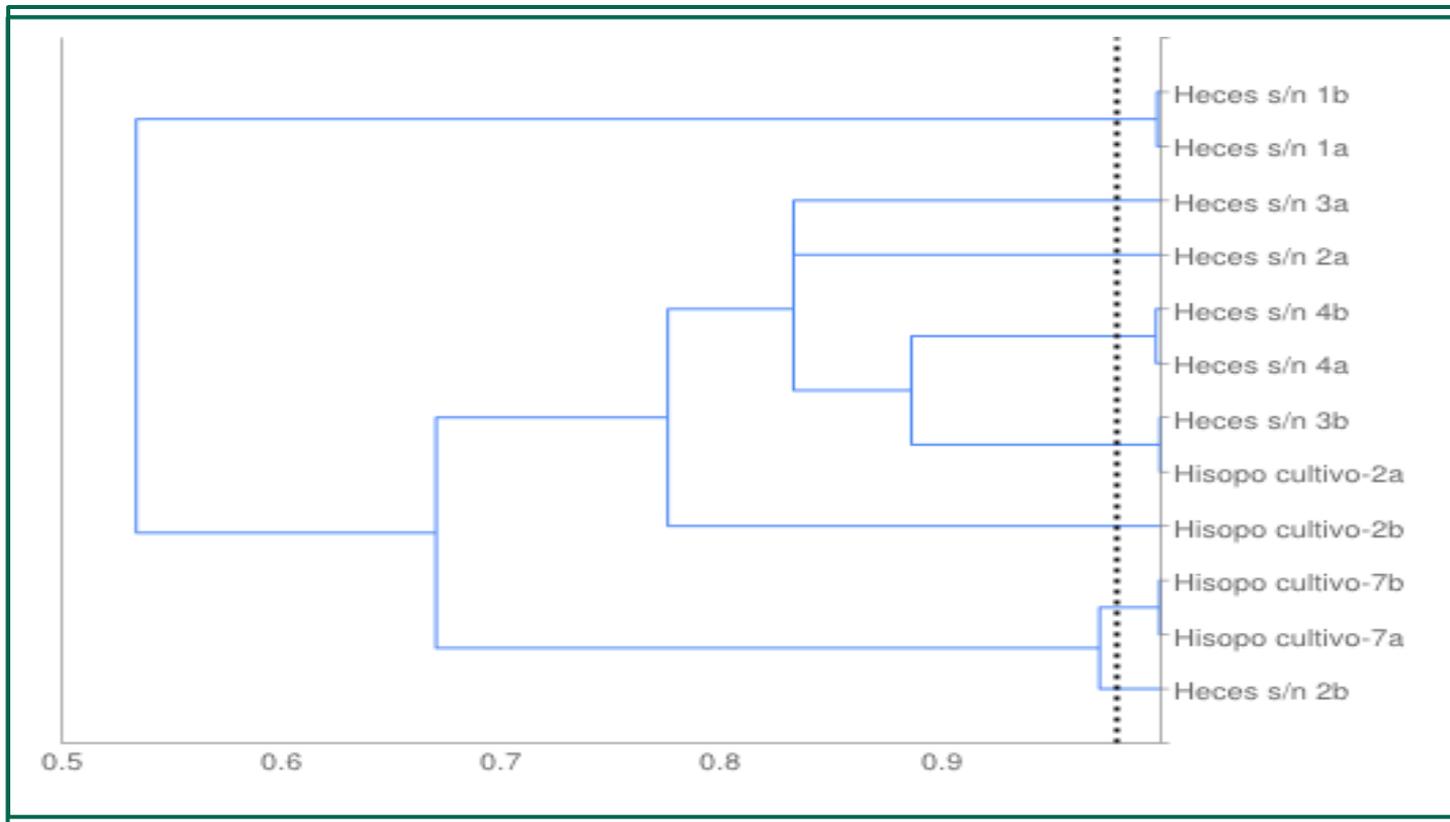
AUTOVACUNAS

COLIBACILOSIS + ROTAVIRUS



AUTOVACUNAS

SIN DIAGNÓSTICO DE COLIBACILOSIS



AUTOVACUNAS

- ▶ ▶ ▶ **La tipificación fenotípica basada en el perfil bioquímico nos permite identificar las cepas mayoritarias presentes en un brote de colibacilosis para ser incluidas en una autovacuna**
- ▶ ▶ ▶ **Es posible comparar cepas aisladas en distintas fechas o momentos productivos**
- ▶ ▶ ▶ **Una vez identificadas las cepas mayoritarias estas pueden caracterizarse genéticamente en base a sus factores de virulencia**





EXOPOL

autovacunas & diagnóstico