

Integridad intestinal en primeras edades porcinas

Pruebas de campo

Biomarcadores, Inflamación e Índices de salud intestinal

Introducción

La Diarrea Postdestete de los Lechones (DPdL) es un cuadro clínico de etiología multifactorial cuyos principales desencadenantes son la reducción de ingesta consecuente al destete y la adaptación del epitelio intestinal a la transición alimenticia desde la leche materna al pienso.

La presentación acostumbra a ser grupal, las bandas afectadas sufren *pérdida primaria de integridad epitelial intestinal*; en ocasiones, también *alteraciones inflamatorias intestinales* y, en todos los casos, trastornos fisiológicos, nutricionales e inmunes provocados por la alteración de la integridad y la modificación del *perfil de la microbiota*.

Ocludina, zonulina y claudina constituyen la trama del epitelio celular columnar monocapa de la mucosa intestinal, componen las denominadas *uniones estrechas*, el ayuno y la ingesta reducida descomponen la integridad intestinal y las proteínas de unión pasan a la sangre y a las heces.

El uso del ZnO ha tenido un efecto preventivo muy positivo en el control de la DPdL, en el actual marco legal de prohibición de su utilización es necesaria una *renovación zootécnica*; con introducción de nuevas prácticas de manejo, sanitarias, alimenticias y nutricionales y posibles ayudas bióticas cuyos resultados deben estudiarse in situ en cada caso mediante pruebas de campo específicas.

Se puede experimentar con muchas posibilidades: vacunas, probióticos, prebióticos, simbióticos, perfiles proteicos y de fibras, tránsito intestinal, balance electrolítico, nuevos ingredientes, aditivos, enzimas, piensos y métodos de su suministro, tipos de tolva, lactancia artificial suplementaria, edad del destete...

Recomendaciones previas a cualquier prueba de campo

No tiene sentido ensayar factores de mejora de la integridad intestinal en un entorno de inestabilidad sanitaria, puede hacerse en situación de *infección estable* por Ecoli, Rota o Coronavirus, PRRS, Influenza, etc. al destete, que son frecuentes. Siempre experimentaremos en ausencia de clínica.

Cuando se utilizan agentes oxidantes para la potabilización del agua de bebida, debe comprobarse su correcta dosificación. La sobredosificación irrita la mucosa intestinal, produce trastornos histológicos, digestivos, electrolíticos y provoca disbiosis insana de la microbiota.

La organización de un grupo control es necesaria. Es poco riguroso y nada útil trabajar solo con un grupo experimental. Los valores normales de los biomarcadores de integridad e inflamación intestinal en primeras edades son aún poco conocidos, la estandarización de métodos analíticos y las referencias comparativas entre los grupos estudiados son la base de la interpretación de resultados.

Elección de Biomarcadores de integridad

Nuestra recomendación para valorar los resultados de estudios dirigidos a todo lo anterior, es la monitorización de la **integridad intestinal** a partir de la cuantificación del nivel plasmático de **occludina** (proteína relevante de unión estrecha y con buena especificidad analítica).

Si organizamos un grupo experimental y lo exponemos a un nuevo elemento o criterio productivo y analizamos sus niveles de occludina en sangre, podremos valorar su integridad intestinal y compararla con la de un grupo control manejado con las condiciones productivas estándar de la granja diana.

El estudio lo proponemos a modo de seroperfil longitudinal clásico, en paralelo a la monitorización de los índices zootécnicos, que es igual de importante.

Entendemos que el objetivo laboratorial principal es *medir la evolución de la integridad intestinal* y que *la valoración de la inflamación no es imprescindible*, aunque también tiene utilidad en determinadas situaciones (conocimiento, resultados inesperados, patología...).

Elección de Biomarcadores de Inflamación. Comentarios

Al abordar el estudio de la DPdL es importante *distinguir entre integridad e inflamación* y tener claro que es lo que queremos valorar. Lo primero, entendemos que es el principal indicador y, suficiente en muchas ocasiones. Para lo segundo, existen diferentes posibilidades.

TNF- α es una citocina de respuesta antigénica específica muy sensible a la endotoxina.

Las proteínas de fase aguda son un indicador de la respuesta general a la inflamación, las interleucinas lo son de la respuesta adaptativa.

Las Interleucinas IL-4, IL-6, IL-8 e IL-12 pueden utilizarse como biomarcadores de inflamación. IL-6 es el indicador considerado como más precoz a la respuesta séptica.

IL-10 y TGB- β (factor de crecimiento transformante) son indicadores de actividad celular, con un papel general antiinflamatorio que puede llegar a ser proinflamatorio en algunas ocasiones.

El listado de biomarcadores de salud conocidos y con referencias bibliográficas en porcino es considerable, en modo servicio ordinario no podemos dar respuesta en tiempo y coste razonables a cualquier determinación que se nos solicite.

Sigue una propuesta concreta, adaptada al estudio de la Inflamación intestinal, pensamos que es suficiente, aunque el listado no es definitivo y queda en espera de nuevas, sugerencias y experiencias.

También disponemos de pruebas para el estudio de la Salud y del Underperforming: Hematología y Bioquímica Funcional, Bioquímica de Daño muscular, Inmunoglobulinas y Encalostramiento (en suero y leche o calostro), Respuesta inmune adaptativa, Fase aguda, Estrés oxidativo y Estrés fisiológico crónico.

Técnicas para el estudio de la inflamación intestinal

Calprotectina.

Prueba utilizada en Medicina Humana, especialmente la fecal. También se valora en suero. Está considerada un marcador específico de inflamación intestinal, aunque verdaderamente lo es de actividad de neutrófilos, que liberan esta proteína cuando acuden a las zonas inflamadas del tracto gastrointestinal. La permeabilización del intestino inflamado permite que aumente su nivel en las heces y, también en la sangre por difusión paracelular.

Se utiliza para la monitorización de enteritis crónicas, como la Enfermedad irritativa intestinal, la Colitis ulcerosa y la Enfermedad de Crohn.

No tenemos información sobre la precocidad de su alteración en enteritis agudas.

No tiene utilidad en alteraciones por déficit de integridad no inflamativo...disbiosis, hipotermia, malabsorción, etc., podría ser el caso de algunas DPdL.

Esta determinación puede solicitarse a posteriori en segunda intención para valorar pruebas con resultados malos o inesperados (las muestras de suero se conservan durante 2 años) o en cualquier situación en la que se quiera estudiar la inflamación además de la integridad intestinal.

Con la misma cronología de muestreo que proponemos en el formulario adjunto, se pueden sustituir las tomas de sangre por otras de heces, el planteamiento también es interesante, en este caso es posible la determinación de ocludina y calprotectina a partir de la misma muestra fecal; aunque el muestreo es más laborioso, el transporte más delicado y el estudio de mayor coste.

También resulta práctica su solicitud complementaria en los casos en los que se toman muestras de heces para el estudio del perfil de la microbiota.

TNF- α (tumor necrosis factor o factor de necrosis tumoral).

Es una citocina producida por macrófagos y otras células. Está relacionada con la infección, la enfermedad reumatoide humana y diversas patologías.

Se activa por respuesta antigénica específica, estimulando la fase aguda de la reacción inflamatoria. Es especialmente dañino cuando abandona áreas locales y actúa sobre todo el organismo; reduce el apetito, puede llegar a producir shock séptico y coagulación intravascular diseminada.

Su activación está mediada muy especialmente por las endotoxinas bacterianas que predominan en las microbiotas de perfil mayoritario Gram NEG, sus niveles altos son indicativos de inflamación intestinal. Es muy susceptible a la estimulación por el LPS de Escherichia coli.

En porcino, sus niveles elevados en sangre son un indicador directo y simultáneo de inflamación y/o endotoxemia, los valores incrementados pueden indicar indirectamente un perfil de microbiota de baja salud intestinal.

También tiene utilidad en cerdas en lactación para el diagnóstico de la Hipoagalaxia transitoria postparto.

Se valora en muestras de suero.

IL-6 (Interleucina-6 o Interleukin-6).

Es una interleucina antiinflamatoria y proinflamatoria de respuesta inmune adaptativa precoz especialmente implicada en la agresión séptica, es un estimulante general del sistema inmunitario. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa por estimulación del TNF- α . Más precoz y sensible a la respuesta séptica que el TNF- α y menos al estímulo por endotoxinas.

Se ha usado para el seguimiento de pacientes graves de Covid-19.

En Producción Animal se utiliza a para la monitorización del Estado de Salud Infecciosa General (PRRS, Influenza, Glässer, Poliserositis, etc) de grupos de animales con especial interés de control (centinelas, lotes experimentales, cuarentenas, etc.).

Además, tiene interés como *marcador general* de infección en el caso de testado de aditivos inmunomoduladores por estudio comparativo de resultados entre los grupos experimental y control.

TGF- β (Factor de crecimiento transformante beta o transforming growth factor beta).

Es una citocina multifuncional implicada activamente en la respuesta anti-inflamatoria, aunque también puede tener efectos pro-inflamatorios. Es un activador celular general de la respuesta inmune.

Como en los casos anteriores de la calprotectina, TNF- α e IL-6, esta determinación tiene interés para valorar a término pruebas con resultados malos o inesperados o en cualquier situación en la que se quiera valorar la inflamación y la sanidad por enfermedades infecciosas además de la integridad intestinal.

Tiene especial interés en los estudios de eficacia de determinados aditivos que modulan la respuesta inflamatoria o desnaturalizan factores antinutricionales que pueden producirla.

Puede solicitarse en primera intención o a posteriori desde muestras de suero de recuperación de la seroteca.

Perfiles de salud intestinal. Muestreo de heces

El final del post-destete es un momento con mucho interés para el estudio de la salud intestinal mediante la valoración del perfil de la microbiota.

Los primeros Índices de salud intestinal se realizaron en estaciones experimentales cunícolas a partir de muestras de contenido cecal, que se sembraban de inmediato a su toma; así se valoraba en tiempo real el ratio de los recuentos intestinales de *Escherichia coli* y *Lactobacillus* spp.

La frescura de las muestras de heces y la estandarización de los procedimientos eran determinantes de la fiabilidad y repetibilidad de los resultados.

El perfil de la microbiota de las heces es dinámico, fuera del intestino sigue evolucionando, aunque con una cinética distinta a la de las condiciones fisiológicas.

Cuando se quiere realizar este tipo de técnicas en un laboratorio alejado, el enfriado inmediato de las muestras después de su toma y la duración y temperatura del transporte también son determinantes.

Para obtener recuentos significativos debe tenerse en cuenta todo lo anterior. La estandarización rigurosa de toma y transporte de las muestras también son imprescindibles para tener resultados comparables.

Es igualmente importante el correcto manejo de las muestras en el laboratorio, la repetibilidad y la comparabilidad pasan por la estandarización de métodos y la frescura de los medios de cultivo que es determinante.

Por propia experiencia, sabemos que todo lo anterior puede manejarse adecuadamente y que se obtienen buenos resultados con muestras transportadas, también en el caso de estudios genómicos cuando la extracción del ADN se realiza en muestras bajo las mismas condiciones que aquí se proponen.

Prevenir al Laboratorio del día de envío de las muestras y de su número.
(Suministro de material de muestreo y preparación de medios la víspera)

Con un contenedor de boca ancha, tomar 5-15 gr de muestra individual de heces
(Toma directa del recto, sentando el lechón en el contenedor sobre su grupa)
(Estimulación con dedo de guante o bulbo de un termómetro en caso necesario)

Abatir de inmediato hasta 2-3°C la temperatura de las muestras
(Frigorífico, no congelar)

Mantener la cadena de frío hasta el momento de la recogida de las muestras por el transportista

Transporte rápido, entrega <10 h. fecha siguiente recogida, asegurando la refrigeración
(Envase isotérmico y placas refrigerantes suficientes)

Verificación de la temperatura de llegada al laboratorio

En el caso de estudios de expresión génica o cuantificación mediante qPCR se seguirán las mismas recomendaciones anteriores, aunque los segundos hoy por hoy no discriminan bacterias muertas por lo cual vemos más recomendables los recuentos tradicionales cuyos resultados corresponden a gérmenes cultivables.

La secuenciación del gen ribosómico 16S también tiene interés para el estudio del perfil de la microbiota, es más costosa que los índices de salud tradicionales y aporta un punto más de información.

Para los estudios moleculares existen conservantes de muestras, los laboratorios los pueden suministrar. Están especialmente indicados para realizar estudios moleculares y contraindicados para los muestreos destinados a recuentos bacterianos tradicionales.