



Veterinaria México



ISSN 0301-5092



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Contenido

Artículos científicos

Original research articles

Uso de un modelo univariado de series de tiempo para la predicción en el corto plazo del comportamiento de la producción de carne de bovino en Baja California, México

The use of a univariate time series model to short term forecast the behaviour of beef production in Baja California, Mexico

Alberto Barreras Serrano

Eduardo Sánchez López

Fernando Figueroa Saavedra

José Ángel Olivas Valdez

Cristina Pérez Linares.....1

Transmisión de *Brucella abortus* en becerras menores de tres meses, diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en dos hatos lecheros del estado de Querétaro

Transmission of Brucella abortus to female calves younger than three months of age, diagnosed by the card and radial immunodiffusion tests in two dairy herds in the state of Queretaro, Mexico

Iván Carrisoza-Urbina

Mario Medina-Cruz

Erika Gabriela Palomares-Reséndiz

Efrén Díaz-Aparicio.....11

Caracterización de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* en exudado faríngeo de bovinos productores de carne clínicamente sanos en el estado de Querétaro

Characterization of capsular types of Pasteurella multocida isolated from clinically healthy beef cattle pharyngeal exudate in the state of Querétaro

Ana Lilia Villegas Vázquez

Víctor Manuel Campuzano-Ocampo

Rigoberto Hernández-Castro

Francisco Suárez-Güemes

Francisco José Trigo Tavera

Carlos Julio Jaramillo-Arango19

Inactivación del metacestodo de *Taenia solium* a través del proceso de compostaje: una realista alternativa aplicable en el medio rural en México

Metacestode of Taenia solium inactivation by composting: a feasible alternative in rural areas of Mexico

Habacuc Esquivel

Nelly Villalobos

Alejandro Vargas

José-Juan Martínez-Maya.....29

Artículo de revisión

Review article

Factores estresantes en lechones destetados comercialmente

Stress factors in weaned piglet

Daniel Mota Rojas

Patricia Roldán Santiago

Efraín Pérez Pedraza

Roberto Martínez Rodríguez

Elein Hernández-Trujillo

María Elena Trujillo Ortega.....37

Notas de investigación

Short communications

Estudio coprológico y ultrasonográfico en perros y borregos de una comunidad suburbana en el Estado de México, para la búsqueda de *Echinococcus* spp

Coprological and ultrasonographic study in dogs and sheep of a suburban community in the Estado de México in search of Echinococcus spp

Ulises Rodríguez-Prado

América Gutiérrez-Marín

Joel Martínez-Ocaña

Mirza Romero-Valdovinos

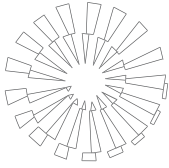
Angélica Olivo-Díaz

Rigoberto Hernández-Castro

Ana Flisser

Pablo Maravilla

José-Juan Martínez-Maya.....53



Uso de un modelo univariado de series de tiempo para la predicción, en el corto plazo, del comportamiento de la producción de carne de bovino en Baja California, México

The use of a univariate time series model to short term forecast the behaviour of beef production in Baja California, Mexico

Alberto Barreras Serrano* Eduardo Sánchez López* Fernando Figueroa Saavedra*
José Ángel Olivas Valdez* Cristina Pérez Linares*

Abstract

The Box-Jenkins methodology was used to select an ARMA model to forecast beef production in Baja California, Mexico. The series of bovine carcasses processed monthly in the state's slaughterhouses between 2003 and 2010 was used. Because the inspection of the series graph and correlogram did not determine a stationary behavior, an augmented Dickey-Fuller test was performed and it was found that the series was stationary. As a result of identification procedure, an AR (1) and an ARMA (2, 1) models were selected and estimated using ordinary least squares. The estimated models were compared using the significance of the regression coefficient and the Akaike information and Schwartz Bayesian criteria. A diagnostic check was done examining the goodness of fit of the models by plotting the residuals; the Q statistic was used to test for autocorrelation. Because the results were similar, a predictive efficacy evaluation of two models was carried out using a group of forecast error statistics. The result of these tests indicated that the ARMA (2,1) had a better forecasting capability, this was supported by plotting together a forecasted series with the actual series and the out-of sample prediction for January of 2011. The results support the use of ARMA models to obtain reliable short term forecasts of beef production in Baja California.

Key words: BEEF, TIME SERIES, ARMA, FORECASTING.

Resumen

Con el fin de pronosticar la producción de carne de bovino en Baja California, México, se utilizó el método de Box-Jenkins para seleccionar un modelo autorregresivo de promedios móviles (ARMA). Para ello se usó la información de canales de bovinos procesados mensualmente en los rastros del estado durante el periodo de 2003 a 2010. Debido a que la inspección de la gráfica de la serie y el correlograma de la misma no permitieron establecer la estacionariedad, se aplicó la prueba de Dickey-Fuller aumentada, en la que se encontró que la serie era estacionaria. Como resultado del procedimiento de identificación se seleccionaron los modelos AR(1) y ARMA (2,1), los cuales se estimaron utilizando mínimos cuadrados; se compararon ambos modelos con base en la significancia de sus coeficientes de regresión y los estadísticos de Akaike y Schwartz. Se llevó a cabo una evaluación diagnóstica para revisar la bondad de ajuste de los modelos mediante la gráfica de los residuales; el valor de los estadísticos Q se utilizó para determinar la ausencia de autocorrelación en los modelos propuestos. Debido a que los resultados fueron similares, se llevó a cabo una evaluación de la eficiencia predictiva de ambos modelos utilizando una serie de estadísticos. Los resultados de estas pruebas indicaron que el modelo ARMA (2,1) presentaba una mejor capacidad predictiva, que fue corroborada mediante una gráfica conjunta de la serie actual y la pronosticada, y una predicción para el mes de enero de 2011. Los resultados respaldan el uso de modelos ARMA para obtener, a corto plazo, predicciones de la producción de carne en Baja California.

Palabras clave: CARNE DE BOVINO, SERIES DE TIEMPO, ARMA, PREDICCIÓN .

Recibido el 25 de junio de 2013 y aceptado el 2 de diciembre de 2013

*Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California. Colonia Colorado 2, Valle de Mexicali. Autor para correspondencia: Eduardo Sánchez López. Teléfonos: Oficina: (686) 5 63 69 07. Celular: (686) 9 46 00 93. Correo electrónico: edsanmxl@hotmail.com.

Introduction

Beef production in the state of Baja California, Mexico is focus on the production of high quality beef, and because of this, the animals are fattened in feedlots with concentrated feed;¹ this type of production system is one of the reasons why the activity has become very important based on its monetary value, which in 2010 was close to 300 million dollars, placing Baja California's beef production as the third most important in Mexico, another important characteristic of the state's production is that, between 2003 and 2010, it showed a growing trend of 71%;² additionally, beef production showed a stationary behavior.

The agricultural production forecasts establish by government agencies are viewed as important tools by farmers and ranchers in their decision making process and because of this it is recommended that this are efficient and unbiased,³ so it is consider very important by policy makers and producers to have access to tools that help them to better understand the market behavior and that may be useful to better predict its direction.⁴

Considering the variability that the supply of beef shows, its growth and the fact that as all agricultural productions are affected by biological and climate factors,⁵ it is important to understand as much as possible how the beef supply behaves. To achieve this, the selection and estimation of a statistical model with good predictive characteristics is highly recommended so that is possible to best represent the true data generating process (DGP)

In economic research, multivariate regression models are widely used for prediction purposes; however, their result are not always good;⁶ for this reason economist have resorted to univariate time series models which frequently provide better forecasting results, but this models have the disadvantage that no theoretical foundation is required for its construction due to the fact that all the information about the variable is obtained from the variable itself;⁷ nevertheless, this type of models may be seen as a good option to predict the behavior of agricultural production when no contribution to understanding the underling process is intended.

Because of its good results in the estimation of univariate times series, the Box-Jenkins methodology has been widely used.⁸ The method considers three stages aimed at selecting an autorregressive moving average model (ARMA): identification, estimation and diagnostic checking.⁹ The ARMA model combines a autorregressive (AR(p)) and a moving average process

Introducción

La producción de carne de bovino en el estado de Baja California está enfocada a producir carne de alta calidad, para lo cual se utilizan principalmente sistemas intensivos en los que el ganado es engordado con alimento concentrado;¹ estas características respaldan a la producción como una actividad pecuaria de gran importancia, cuyo valor en 2010 fue de 3 549 107 000 pesos, cifra que la ubica en el tercer lugar a nivel nacional.² Con respecto al comportamiento de la oferta de canales de res se observa una tendencia de crecimiento, como lo demuestra el hecho de que entre enero de 2003 y diciembre de 2010 la producción presentó un incremento de 71%,² adicionalmente la carne de bovino muestra un comportamiento muy estacional.

Hay factores importantes que influyen en la toma de decisiones de los integrantes del sector agropecuario, como las predicciones y estimaciones de producción que establecen las agencias gubernamentales, por lo que deben ser eficientes y no sesgadas.³ Por esta razón es conveniente, tanto para los productores estatales como para los diseñadores de política pública agropecuaria, disponer de medios que ayuden a conocer el comportamiento del mercado y que permitan el acceso a información actualizada que posibilite predecir el rumbo del mercado.⁴

Dada la variabilidad que presenta la oferta de carne de res y su nivel de crecimiento en una producción pecuaria se ve influida por factores biológicos y climáticos,⁵ es relevante conocer con profundidad el comportamiento de esta oferta. Para este fin es fundamental la selección y estimación de un modelo estadístico con adecuada capacidad predictiva que permita representar el proceso generador de información (PGI).

En el análisis económico, los modelos de regresión lineal multivariados han sido ampliamente utilizados con fines predictivos; sin embargo, sus resultados han sido pobres,⁶ por lo que los economistas han recurrido a los modelos de series de tiempo univariados, logrando con ello mejores predicciones, pero con la desventaja de que la construcción del modelo no tiene un fundamento teórico, pues se basa en el uso del comportamiento de la misma variable para realizar la predicción;⁷ sin embargo, y a diferencia de las variables económicas, en el estudio del comportamiento de las producciones agropecuarias la fundamentación teórica del modelo no es relevante, lo cual incrementa la aplicabilidad de un modelo de series de tiempo.

En la estimación de series temporales se ha utilizado ampliamente la metodología de Box-Jenkins, por los buenos resultados obtenidos.⁸ El método de Box-Jenkins⁹ consta de tres etapas para la selección de un

(MA(q)). The general form of the model is the following ARMA (p,q)⁷:

$$Y_t = \Phi_1 Y_{t-1} + \Phi_2 Y_{t-2} + \dots + \Phi_p Y_{t-p} + u_t + \Phi_{p+1} u_{t-1} + \Phi_{p+2} u_{t-2} + \dots + \Phi_{p+q} u_{t-q}$$

Where:

$$|\Phi| < 1 \text{ and } u_t = \text{error term}$$

In a comparative study of econometric models used to predict agricultural production and prices it was found that the results were poor; however, of all the models considered in this research, the autorregresive integrated moving average models (ARIMA) showed the best results.⁵

Material and methods

A descriptive and retrospective study, in which a group of ARMA type models were estimated and evaluated following the Box-Jenkins method, was used to select a final model to predict the behavior of the relevant variable.

Due to the nature of the model it was only necessary to use the tons of beef produced monthly in Baja California, Mexico between January 2003 and December 2010 as reported by the agricultural and fishery information system (SIAP).²

Taking into account that the use of an ARMA type model is recommended only when the behavior of the variable (Y_t) is stationary, the reason for this being that the series mean, variance and covariance are constant in the long run.¹⁰ If a series is non stationary than it is necessary to transform it to induce stationarity through differentiation,¹¹ The first differences of a series Y_t are given by the following equation:

$$\Delta Y_t = Y_t - Y_{t-1}$$

Where:

$$\Delta = \text{change of } Y_t$$

The identification stage starts by determining stationarity using three evaluations: checking of the series graph so that it is possible to detect structural changes in the data or the presence of outliers;¹² the second evaluation is done through the examination of the autocorrelation (AC) and partial autocorrelation (PAC) functions plots, to see if these functions in the various lags are distributed around zero,¹³ if this is the case then there is a strong indication that the series is stationary, the third evaluation is through the use of the augmented Dickey-Fuller unit root test, this test considers three possible forms: a model that includes a constant, a model with a constant and linear trend and one with neither a constant or a trend.¹⁴

modelo autorregresivo de promedios móviles (ARMA): la identificación, estimación y revisión diagnóstica. El modelo ARMA combina los procesos autorregresivo (AR(p)) y de promedios móviles (MA(q)); se le denomina con la sigla ARMA (p,q) porque se acompaña en su definición con los órdenes correspondientes (p,q), y es representado de la siguiente forma general:⁷

$$Y_t = \Phi_1 Y_{t-1} + \Phi_2 Y_{t-2} + \dots + \Phi_p Y_{t-p} + u_t + \Phi_{p+1} u_{t-1} + \Phi_{p+2} u_{t-2} + \dots + \Phi_{p+q} u_{t-q}$$

Donde:

$$|\Phi| < 1 \text{ y } u_t = \text{es el término de error}$$

Un estudio sobre predicción económica en la agricultura reporta que la predicción de producción y precios agrícolas con modelos econométricos arroja pobres resultados; sin embargo, en él se encontró que entre las diferentes opciones de modelos, los de series de tiempos autorregresivos integrados de promedios móviles (ARIMA) lograba los mejores resultados en cuanto a precisión.⁵

Material y métodos

El tipo de estudio fue descriptivo retrospectivo, en el cual se estimaron y evaluaron modelos de series de tiempo univariados tipo ARMA para pronosticar el comportamiento de la variable, utilizando para ello la metodología de Box-Jenkins.

Debido a la naturaleza del modelo empleado, sólo fue necesaria una serie temporal de producción de carne de bovino y por ello se utilizó el número de toneladas mensuales de canales procesadas en rastros de enero de 2003 a diciembre de 2010, reportadas por el servicio de información agroalimentaria y pesquera.²

Dado que un modelo ARMA sólo tiene utilidad en la estimación cuando Y_t es estacionaria, ya que ello significa que la media, varianza y covarianza de la serie son constantes a lo largo del tiempo,¹⁰ entonces cuando la estacionariedad no es evidente, es necesario inducir la diferenciación.¹¹ Las primeras diferencias de una serie están dadas por la ecuación:

$$\Delta Y_t = Y_t - Y_{t-1}$$

Donde:

$$\Delta = \text{cambio}$$

La identificación del modelo inició determinando la posible estacionariedad de la serie a través de tres evaluaciones: la primera es la revisión del comportamiento de la producción a lo largo del tiempo, ya que además de los indicadores de un comportamiento no estacional como la ausencia de una media o varianza constante y una clara tendencia, se obtiene informa-

In case the series resulted non stationary, then stationarity needs to be induce obtaining the first differences of the series by subtracting to each value the immediate past value⁶ followed by a new ADF test to confirm stationarity; if the condition is not obtained after differentiating, further differencing is applied until the series becomes stationary. Once the series is stationary, the procedure is continued by identifying the p and q orders by examining the behavior of the AC and ACP functions graphs. So that it is possible to propose a group of alternative models with different AR(p) and MA(q) combinations.

The candidate models were estimated and compared using the regression coefficients and the Akaike information criterion (AIC) and the Schwartz Bayesian criterion (SBC).⁸ The probable models selected were used to search for the presence of extreme values and periods when the model fails to fit, and also the Ljung-Box Q statistic⁷ was applied to determine presence of autocorrelation. To make a final selection the candidate models were submitted to a predictive efficacy evaluation using the following statistics:¹⁵ mean absolute error (MAE), the root mean squared error (RMSE), Theil's inequality coefficient (TIC), bias proportion (BP), variance proportion (VP) and the covariance proportion (CP). All estimations, hypothesis testing and calculations were performed using the EvIEWS 6 econometric program¹⁶ (Quantitative Microsoftware).

Results

The visual inspection of the series graph (**FIGURE 1**) showed a positive trend and a non constant mean which indicated that beef production was non stationary.

As suggested by the Box-Jenkins methodology the series correlogram was inspected, and no evidence of stationarity was found, so the ADF test was applied as the final step to determine if the series was stationary, the result was that the non stationary hypothesis was rejected ($P < .01$), so the series was considered stationary and no differencing was needed.

The identification stage was continued by selecting and evaluating a series of models with different p and q combinations through the inspection of their correlogram. The regression model parameters were estimated and their coefficients tested to determine if their values were $\neq 0$ (**TABLES 1 AND 2**). Based on these results and using AIC and SBC, a AR(1) and a ARMA(2,1) were selected.

The diagnostic check of the final two models using the significance of the coefficients and the smaller value of AIC and SBC, suggested that the AR(1) is the best model. In both models the Q statistic test was used and no evidence of autocorrelation was found.

ción sobre valores extremos o cambios estructurales de los datos;¹² en la segunda se realizó la revisión de los comportamientos de las funciones de autocorrelación (AC) y de autocorrelación parcial (ACP) del correlograma, pues se considera que si estas funciones en los distintos rezagos se ubican alrededor de cero, indican un comportamiento estacionario de la serie;¹³ y en la última, para determinar la posible estacionariedad de la serie se aplicó la prueba de Dickey y Fuller aumentada (DFA), considerando tres posibles formas en la descripción del proceso: sin intercepto ni tendencia, sólo con intercepto y con ambas.¹⁴

En el caso de que la serie resultara no estacionaria, ésta sería transformada para obtener las primeras diferencias de la variable restando a cada valor el inmediato anterior⁶ y se sometería a una nueva DFA, si la no estacionariedad de la variable persiste, entonces se continuaría diferenciando hasta alcanzarla. Una vez lograda o confirmada la estacionariedad, el procedimiento continuó identificando los órdenes p y q del probable modelo ARMA mediante la observación del comportamiento de las gráficas de las funciones AC y ACP. A partir de la definición inicial de los órdenes p y q se propusieron varios modelos alternativos con diversas combinaciones AR (p) y MA(q).

Los modelos propuestos se compararon entre sí utilizando el valor de los coeficientes y la obtención de los valores más pequeños para los criterios de información de Akaike (AIC) y Schwartz (SC).⁸ Con los probables modelos seleccionados se realizó la revisión diagnóstica utilizando la gráfica de los residuales en busca de valores extremos y evidencia de periodos en los cuales el modelo no se ajusta a los datos, y aplicando el estadístico-Q de Ljung-Box⁷ para determinar la presencia de autocorrelación. Adicionalmente se evaluó la capacidad predictiva del modelo como criterio de ratificación, para lo cual se utilizaron los siguientes estadísticos de calidad del ajuste:¹⁵ error promedio porcentual absoluto (EPAP), raíz cuadrática media del error (RCME), el coeficiente de desigualdad de Theil (CDT), la proporción de sesgo (PS), la proporción de la varianza (PV) y la proporción de covarianza (PCV). Las estimaciones, pruebas de hipótesis y evaluaciones se realizaron con la ayuda del programa econométrico EvIEWS, versión 6.¹⁶

Resultados

La revisión de la serie mediante la inspección visual de la gráfica de la producción de carne de bovino (**FIGURA 1**) indicó un posible comportamiento no estacionario, dada la tendencia positiva de la serie y una media no constante.

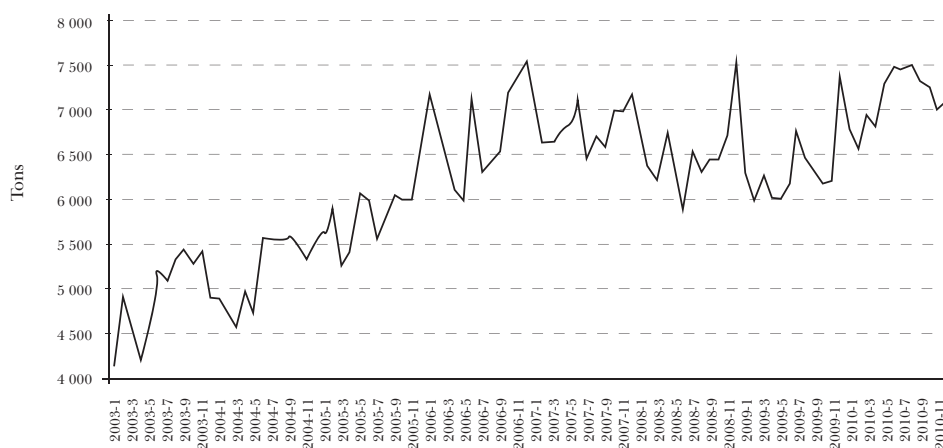
Continuando con el método de Box Jenkins se revisó el correlograma de la serie, sin que se pudie-

Although the diagnostic checking indicated that the AR(1) was the most appropriate, the similarity of the results between the models supported the use of the predictive efficiency evaluation using the MAE, RMSE, TIC, BP, VP and CP tests (TABLE 3).

Based on the results of the predictive tests, the ARMA(2,1) is more appropriate, both the TIC and RMSE results indicate that this model shows a better predictive capacity and this is supported by a small PS (< 0.1) value. On the other hand, the lower VP indicates that ARMA (2,1) model does a better job to replicate the variability of the DGP; only the CV favors the AR (1) model; however, the difference is very small and finally the smaller MAE was taking into account to

ra determinar la estacionariedad, por ello se procedió a aplicar la prueba DFA. Para determinar de manera formal el comportamiento de la serie, el resultado de la prueba fue el rechazo de H_0 ($P < .01$); debido a ello la serie fue considerada como estacionaria, por lo que no fue necesario aplicar un proceso de diferenciación.

La fase de identificación continuó con la selección y evaluación de posibles procesos con diferentes combinaciones p y q mediante la revisión de sus correlogramas. Se estimaron los parámetros de los modelos de regresión y se sometieron a una prueba de hipótesis de igualdad con cero (CUADROS 1 Y 2). Con base en estos resultados y en la aplicación de los criterios AIC y SC se seleccionaron los modelos AR (1) y ARMA (2,1).



Source: SIAP-SAGARPA

FIGURA 1. Toneladas de carne de bovino producidas mensualmente en Baja California entre 2003 y 2010

FIGURE 1. Metric tons of beef produced monthly in Baja California between 2003 and 2010.

CUADRO 1

Estimación de parámetros y criterios de evaluación del modelo AR (1)

Estimated coefficients and evaluation criteria for AR (1) model

<i>Variable</i>	<i>Coefficient</i>	<i>Std. Error</i>	<i>t-Statistic</i>	<i>P > t</i>
Intercept	6398.725	289.7549	22.08323	0.0000
AR(1)	0.856955	0.047983	17.85963	0.0000
R-squared	0.774253	Mean dependent var		6212.442
Adjusted R-squared	0.771826	S.D. dependent var		818.5265
S.E. of regression	390.9901	Akaike info criterion		14.79607
Sum squared resid	14217213	Schwarz criterion		14.84984
Log likelihood	-700.8133	Hannan-Quinn criterion		14.81779
F-statistic	318.9664	Durbin-Watson stat.		2.247603

select the ARMA (2,1) model. Considering that even when the differences between two or more RMSE values are relatively high, it cannot be ruled out that the model with the higher RMSE may have information that may be relevant when forecasting, and bearing in mind that the predictive evaluation showed marginal differences between the models, it cannot be concluded that the ARMA (2, 1) models exhibits a better forecasting ability, which is backed up by the rest of the similarity statistic values.

To check the fitting of the selected model a forecasted series (prodcarnef) was obtained using a dynamic method, plotted together with the actual series, to visually examine the predictive capability (FIGURE 2).

A comparison between the series actual value for January 2011 and the forecasted values backs up the good forecasting capacity of the selected model, since the actual production was 6,865 metric tons and the forecasted 6,924 metric tons, a difference of only 59 tons.

Discussion

The selected model forecasting results suggest that this type of model may be useful forecasting tools; nevertheless, it is important to consider that when compared with multivariate models, ARMA models are better when short term forecasts are obtained,¹⁵ and that in the case of agricultural variables are not always the best as demonstrated by the results of a United State Department of Agriculture study that compared different type of models,³ when this study compared the USDA traditional model to an ARIMA it was found

La evaluación diagnóstica de ambos modelos utilizando la significancia de los coeficientes estimados y los criterios de Akaike y Schwartz, sugiere que el modelo AR (1) es el más apropiado. Se revisaron los estadísticos Q de los dos modelos, pero no se encontró evidencia de ningún problema de autocorrelación de los residuales.

Aun cuando la revisión diagnóstica permitió la selección del modelo AR (1), los resultados similares entre ambos modelos llevaron a realizar una evaluación del modelo seleccionado mediante la comparación de su eficiencia predictiva con la del modelo ARMA (2,1) utilizando para ello los estadísticos EPAP, RCME, CDT, PS PV Y PCV (CUADRO 3).

De acuerdo con los resultados de los estadísticos, el modelo ARMA (2,1) muestra un mejor ajuste, puesto que tanto el valor del CDT como el de la RCME del segundo modelo indican una superioridad predictiva, la cual es respaldada por el valor inferior a 0.1 de la PS. Por otra parte, el valor más bajo de PV indica que el modelo ARMA (2,1) muestra una mayor capacidad para replicar la variabilidad del PGI; sólo la PCV favorece al modelo AR (1) al indicar una marginal menor correlación entre las predicciones y los valores reales; sin embargo, la diferencia es de apenas una milésima, finalmente el valor del EPAP más pequeño para el primer modelo es también un resultado que favorecería su selección. Tomando en cuenta que en caso de que se observen diferencias significativas entre los valores de la RCME, las predicciones con el valor más alto de este estadístico puede contener información relevante para la predicción, y dado que en este estudio ambos valores de RCME presentan una pequeña diferencia,

CUADRO 2

Estimación de parámetros y criterios de evaluación del modelo ARMA (2,1)

Estimated coefficients and evaluation criteria for AR (1) model

<i>Variable</i>	<i>Coefficient</i>	<i>Std. Error</i>	<i>t-Statistic</i>	<i>P > t</i>
Intercept	6393.052	319.7963	19.99102	0.0000
AR(2)	0.756682	0.084903	8.912338	0.0000
MA(1)	0.880818	0.064319	13.69446	0.0000
R-squared	0.772811	Mean dependent var		6226.255
Adjusted R-squared	0.767818	S.D. dependent var		811.7071
S.E. of regression	391.1236	Akaike info criterion		14.80732
Sum squared resid	13920968	Schwarz criterion		14.88849
Log likelihood	-692.9440	Hannan-Quinn criterion		14.84011
F-statistic	154.7735	Durbin-Watson stat.		2.266438

that the forecast obtained using the autorregresive model was less precise; however, it was also found that the forecasting ability of the USDA model can be improved if they were combined with the predictions of an AR⁴ model. On the other hand, a study done in Colombia¹⁷ using an AR (1, 2) model had good results when used to predict the annual stock of bovine in this country.

It is very interesting that in the present study it was found that beef production in Baja California is stationary because in other studies on beef production done in the United States³ and Colombia¹⁸ the variable was non stationary. It is very important that a series is submitted to tests to determine if it is stationary, because if this characteristic is not present the forecasts are not reliable. The Box-Jenkins methodology recommends that both the visual inspection of the series graph and the ACF and PACF are used to determine if the series is stationary;⁴ however, sometimes this diagnostic tools show difficulties to support the conclusion that the series is stationary and this is why it is recommended to use at least a specifically design test to determine if the series is non stationary.¹⁹

Taking into account that the model identification stage is based on the correlogram evaluation the Box-Jenkins methodology is considered pragmatic,²⁰ this statement is supported by the fact that the underlying process needs not to be understood or explained, and it is not necessary to apply hypothesis testing, this explains why this methodology is not commonly used by traditional econometrists;⁷ however, in the case of series like the ones used in this study, the aforementioned conditions are not as important as in the case of

poco se puede concluir respecto a una mayor capacidad predictiva, resultado que se ve respaldado por la similitud de los valores del resto de los estadísticos.

Para la confirmación de la calidad de ajuste del modelo seleccionado se generó una serie de pronósticos para los datos originales (prodcarnef) (Figura 2) usando el método de predicción dinámica, los cuales se graficaron junto con los valores de la serie original, de tal forma que es posible observar un buen ajuste de las predicciones con la serie original (Figura 2).

Una comparación entre el valor real y el pronosticado para el mes de enero de 2011 respalda la adecuada capacidad predictiva del modelo seleccionado, pues el valor real fue de 6,865 ton, mientras que el valor pronosticado se ubicó en 6,924 ton, de tal forma que la diferencia entre ambos es de apenas 59 ton.

Discusión

Los resultados predictivos obtenidos con el modelo seleccionado sugieren la utilidad de usar estos modelos, no obstante es importante considerar que los modelos ARMA sólo presentan buenas características para pronósticos de corto plazo cuando se comparan con los modelos multivariados,¹⁵ pero los resultados de su uso en la producción agropecuaria no siempre son los mejores, como se demuestra en la evaluación de los modelos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA),³ ya que al comparar su modelo de predicción tradicional con un ARIMA se encontró que las predicciones de este último eran menos precisas; sin embargo, también se informó que la

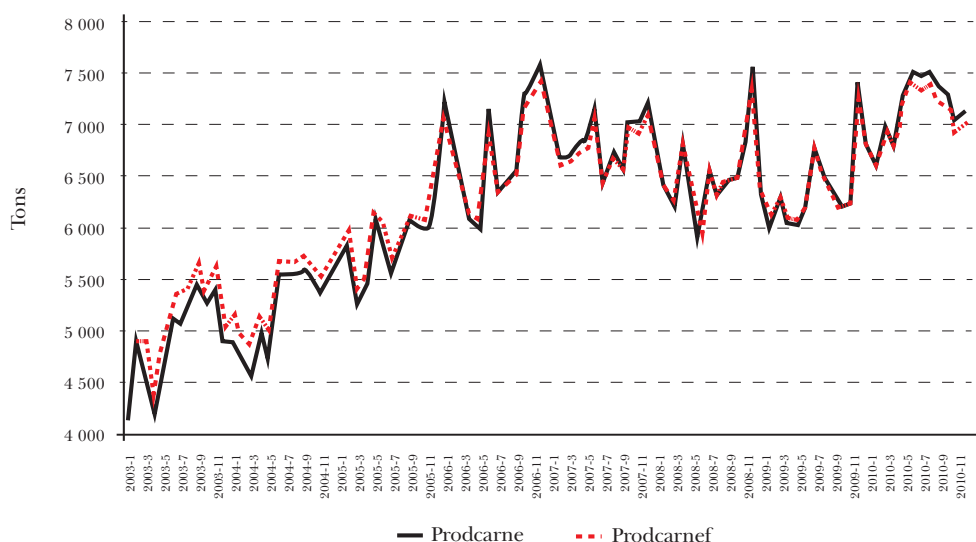


FIGURA 2. Comportamiento de la serie original (prodcarne) y la pronosticada (prodcarnef).

FIGURE 2. Tons of actual (prodcarne) and forecasted (prodcarnef) beef imports.

CUADRO 3

Evaluación de la capacidad predictiva de los modelos AR (1) y ARMA (2,1)

Forecast evaluation of AR (1) and ARMA (2,1) models

<i>Statistic</i>	<i>AR(1) Model</i>	<i>ARMA(2,1) Model</i>
Mean absolute error	4.939030	4.860685
Root mean squared error	386.8525	384.8317
Theil's inequality coefficient	0.030901	0.030675
Bias proportion	0.000000	0.000001
Variance proportion	0.063877	0.062423
Covariance proportion	0.936123	0.937576

economics, because the main objective of the analysis is to obtain a prediction instrument and not to contribute to understand the process which determines how the variable behaves; for this reason, the most important part of the process is the specification of the model functional form.²¹

Considering that to use an ARMA model, 50 or more data points are required,²² an additional element that supports the use of this type of models in agricultural time series is the availability and periodicity of the data, because it is common for the government to report monthly data for a length of more than 10 years.

An important disadvantage that ARMA models have is that their forecasting capacity is only good for short term predictions, and because of this multivariate models should be preferred when making long term forecasts,¹⁵ and considering that the best way to determine if a model is good is to see how well it performs in out of the period predictions, it must be taken into consideration that the usefulness of this models is limited by the fact that the forecasts become less precise as they move away from the estimation period.

According to the results of this study ARIMA may be considered as a viable option to contribute to the understanding how beef production behaves and also to establish forecasts with good forecasting ability, even in cases when the series shows high variability. It is very useful that the process may be studied using a single variable, without establishing relations with other variables, because this diminishes the time needed to build a model and makes it easy to obtain information regarding the future behavior of a variable, which may be used to make better decisions by the beef produc-

capacidad predictiva del modelo de la USDA podía ser mejorada si las predicciones obtenidas se combinaban con las predicciones de un modelo AR.⁴ Asimismo, en un estudio realizado en Colombia¹⁷ se informó que un modelo AR (1,2) tuvo buenos resultados para predecir el inventario anual de ganado bovino.

Resultó interesante la estacionariedad que presentó la variable del presente estudio, pues no coincide con lo registrado en los Estados Unidos de América³ y en Colombia,¹⁸ donde la producción de carne no muestra esa característica. Es fundamental que la serie sea sometida a pruebas para determinar si es estacionaria, pues de lo contrario la capacidad predictiva no será adecuada. La metodología de Box-Jenkins establece que la determinación de la estacionariedad de la serie debe basarse en la inspección de la gráfica de su comportamiento y de las funciones de autocorrelación y autocorrelación parcial;⁴ no obstante, estas herramientas diagnósticas en ocasiones presentan dificultades para respaldar la conclusión de un comportamiento estacionario, por lo que es recomendable utilizar al menos una de las pruebas específicamente diseñadas para establecer que la serie sea estacionaria.¹⁹

Debido a que la fase de identificación del modelo se fundamenta en la evaluación del correlograma, se ha descrito a la metodología de Box-Jenkins como pragmática;²⁰ esta afirmación es respaldada por el hecho de que el proceso subyacente no necesita ser entendido o explicado, ni es necesario aplicar pruebas de hipótesis, lo cual explica la razón por la que la metodología no es comúnmente utilizada por los econométricos tradicionales;⁷ sin embargo, para el caso de series como las que se utilizan en este trabajo, las situaciones antes mencionadas no tienen la relevancia que se les otorga en economía, pues el objetivo que persigue el análisis es contar con un instrumento de

ers and to design and adjust the current public policy related to the industry.

Referencias

1. DELGADO EJ, RUBIO MS, ITURBE FA, MENDEZ RD, CASSIS RD, ROSILES R. Composition and quality of Mexican and imported retail beef in Mexico. *Meat Sci* 2005; 69: 465-471.
2. SIAP 2011. Avance mensual de la producción pecuaria por Estado 2010. Sistema de información agroalimentaria y pesquera. [Serie en línea: 2011 abril] [Citado: 2011 octubre 20] Disponible en: URL: <http://www.siap.gob.mx>.
3. SANDERS DR, MANFREDO MR. USDA production forecasts for pork, beef and broilers: An evaluation. *J Agric R Econ* 2002; 27:114-127.
4. MYERS RJ, SEXTON RJ, TOMEK WG. A century of research on agricultural markets. *Am J Agric Econ* 2010; 92:376-402.
5. ALLEN PG. Economic forecasting in agriculture. *Int J Forecasting* 1994;10:81-135.
6. EVANS MK. Practical Business forecasting. Malden Massachussets: Blackwell Publishers, 2003.
7. ASTERIOU D, STEPHEN GH. Applied econometrics: A modern approach. New York USA: Palgrave MacMillan, 2007.
8. VOGELVANG B. ECONOMETRICS. Theory and applications with Eviews. Essex, UK: Pearson Education Limited, 2005.
9. BOX GEP, GM JENKINS. Time series analysis, forecasting and control. Oakland, California: Holdan Day, 1976.
10. HARRIS R, SOLLIS R. Applied time series modeling and forecasting. West Sussex UK: John Wiley & Sons, 2005.
11. KENNEDY P. A guide to econometrics. 4th ed. Cambridge Massachusetts: MIT press, 1998.
12. ENDERS W. Applied econometrics Time Series. Hoboken New Jersey: Wiley, 2004.
13. GUJARATI, DN, PORTER DC. Econometría. 5ª ed. México DF: Mac Graw Hill, 2010.
14. NGURAH AIG. Time series data analysis using eviews. Singapore: John Wiley & Sons, 2009.
15. PINDYCK RS, RUBINFELD DL. Econometría modelos y pronósticos. 4ta ed. México DF: Mc Graw-Hill, 2001.
16. QUANTITATIVE MICRO SOFTWARE. Eviews 6. Irvine, California, 2007.
17. CUENCA JNJ, CHAVARRO MF, DÍAZ GOH. El sector de ganadería bovina en Colombia. Aplicación de modelos de series de tiempo al inventario ganadero. *Rev Fac Cienc Económicas*. 2008; 16: 165-177.
18. MARTÍNEZ VC. Modelos de pronóstico de la producción bovina. Archivos de economía. Documento

predicción y no el de contribuir a entender el proceso que determina el comportamiento de la variable, por esta razón la especificación de la forma funcional del modelo es considerada como la parte más importante del proceso.²¹

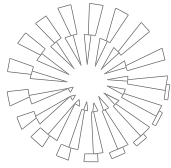
Si se toma en cuenta que los modelos ARMA requieren de 50 o más datos para poder ser aplicados,²² otro elemento que respalda su uso es la disponibilidad y periodicidad de la información que el gobierno da a conocer mediante datos mensuales por más de 10 años.

Una importante desventaja de los modelos ARMA es que sólo tienen una buena capacidad predictiva en el corto plazo, por lo que para predicciones de largo plazo deben utilizarse modelos multivariados,¹⁵ y considerando que la mejor prueba de un modelo es su desempeño predictivo fuera del periodo estimado;⁵ la utilidad de estos modelos se ve limitada por el hecho de que las predicciones disminuyen rápidamente su precisión conforme se alejan del último periodo de la serie utilizada para establecer la predicción.

De acuerdo con los resultados de este estudio, los modelos ARIMA pueden considerarse como una opción viable para describir el comportamiento de la producción de carne de bovino y para establecer pronósticos con buenas características predictivas, aun cuando la serie en estudio presenta una gran variabilidad. Resulta muy atractivo el que el proceso pueda ser aproximado a partir de la transformación de la misma variable, sin necesidad de establecer relaciones contemporáneas, ya que de esta manera se disminuye el tiempo que requiere la construcción del modelo y facilita la obtención de información sobre el comportamiento futuro de una variable que podrá ser utilizada tanto para la toma de decisiones de los productores de ganado de engorda como para el diseño o ajuste de la política pública que está dirigida a la actividad.

269. Departamento Nacional de Planeación Dirección de Estudios Económicos. Bogotá, Colombia, 2004

19. DICKEY DA, BELL RW, MILLER RB. Unit root in time series models: Test and implication. *The Am Statiscian* 1986; 40: 12-26.
20. BROOKS C. Introductory Econometrics for Finance. 2nd ed. Cambridge, Massachusetts: Cambridge University Press, 2008.
21. KOHELER AB, MUMPHREE ES. A comparison of the Akaike and Schwarz criteria for selecting model order. *App Stat* 1988; 37:187-195.
22. Nelson BK. Time series analysis using autoregressive integrated moving average (ARIMA) models. *Aca Emer Med* 1998;5:739-744.



Transmisión de *Brucella abortus* en becerras menores de tres meses diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en dos hatos lecheros del estado de Querétaro

Transmission of *Brucella abortus* to female calves younger than three months of age, diagnosed by the card and radial immunodiffusion tests in two dairy herds in the state of Queretaro, Mexico

Iván Carrisoza-Urbina* Mario Medina-Cruz**
Erika Gabriela Palomares-Reséndiz*** Efrén Díaz-Aparicio ***

Abstract

Transmission of *Brucella abortus* to female calves from positive and negative cows was determined in the first week and third month of age. Two herds were used. Herd 1 consisted of 670 milking cows with a brucellosis seroprevalence of 21.6% (145/670). In this herd, groups of positive and negative cows were formed using the card and radial immunodiffusion (RID) tests with native hapten. Blood samples were taken from female calves on two occasions: at one week of age and before animals were vaccinated against *B. abortus*. Of the 22 calves from the positive group, two (9.1%) were positive in the first week of life, but no more positive calves were found at three months of age. In the group of female calves born to negative cows, there were no positive animals at one week of age, but four out of 22 were found positive with the RID test at three months of age. A prevalence rate of 13.6% of positive calves for *B. abortus* in the third month of age was calculated. Twenty milk samples were obtained from this herd and *B. abortus* was isolated from all of them (100%). Using PCR, the strains found were confirmed to be field strains and not vaccine strains. Herd 2 consisted of 1800 milking cows, participating in the National Campaign against Animal Brucellosis, that had a seroprevalence of 1.94% (35/1800) detected from January to December 2009. In this herd, 1 170 records were analyzed using the results of the card and rivanol tests obtained from female calves younger than three months of age, of which 24 (2.1%) were found positive for *B. abortus* from January 2009 to June 2010. It is concluded that the diagnosis of brucellosis is necessary in female calves born in dairies to cows that have the disease, in order to prevent positive animals from remaining in the herd. Vaccine-induced antibodies will avert disease detection, but brucellosis will later manifest itself through abortions during first pregnancies, thus perpetuating the disease in dairies

Key words: *BRUCELLA ABORTUS*, FEMALE CALVES, RADIAL IMMUNODIFFUSION.

Resumen

La transmisión de *Brucella abortus* a becerras de vacas positivas y negativas se determinó a la primera semana de vida y al tercer mes de edad. Se trabajó con dos hatos: el hato 1, con 670 vacas en producción, presentaba una seroprevalencia a brucelosis de 21.6% (145/670). En este hato se formaron dos grupos: vacas positivas y vacas negativas, como resultado de las pruebas de tarjeta y de inmunodifusión radial (IDR) realizadas con hapteno nativo. Se tomaron pruebas de sangre de las vacas en dos ocasiones, a la semana de edad y antes de que los animales fueran vacunados contra *B. abortus*. De las 22 vacas del grupo positivo, 2 (9.1%) becerras resultaron positivas a la primera semana de vida, pero no se encontraron vacas positivas a los tres meses de edad. En el grupo de becerras nacidas de vacas negativas no se

Recibido el 19 de junio de 2013 y aceptado el 27 de noviembre de 2013.

*Estudiante de Maestría en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

**Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Km. 8.5 Carretera Federal Tequisquiapan-Ezequiel Montes, Tequisquiapan, Querétaro, México

***CENID Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 15.5 Carretera Federal México-Toluca, 05110, Cuajimalpa, DF, México.

Autor para correspondencia: Efrén Díaz Aparicio email: efredia@yahoo.com, teléfono 5536180800, ext.45.

encontraron animales positivos a la semana de vida, pero a los tres meses de edad, 4 de las 22 becerras resultaron positivas con la prueba de IDR. La tasa de prevalencia de vacas positivas a *B. abortus* fue de 13.6% a los tres meses de edad. De las 20 muestras de leche obtenidas de este hato se aisló *B. abortus* (100%). Mediante PCR se confirmó que estas cepas correspondían a cepas de campo y no a cepas vacunales. El hato 2, con 1800 vacas en producción, estaba inscrito en la campaña nacional contra la brucelosis animal y presentaba una seroprevalencia de 1.94% (35/1800) detectada de enero a diciembre de 2009. Se analizaron 1 170 registros usando los resultados de las pruebas de tarjeta y rivanol aplicada en becerras menores de tres meses de edad, de las que 24 (2.1%) resultaron positivas a *B. abortus* de enero de 2009 a junio de 2010. Se concluye que es necesario realizar el diagnóstico de brucelosis en becerras nacidas en establos donde se ha presentado la enfermedad, para prevenir que permanezcan animales positivos en el hato, ya que los anticuerpos posvacunales impedirán detectar la enfermedad, pero posteriormente se manifestará mediante abortos durante la primera gestación, perpetuando así la brucelosis en el estable.

Palabras clave: *BRUCELLA ABORTUS*, BECERRAS, INMUNODIFUSIÓN RADIAL.

Introduction

Bovine brucellosis is the cause of major economic losses due mainly to abortions in the last pregnancy trimester, decreased milk production, anticipated herd waste, birth of weak calves and birth of apparently normal calves, although positive to *Brucella abortus*. In Mexico this disease is widespread in all of the states, except for the northern area of the state of Sonora.¹⁻³

As stated elsewhere,⁴ the prevalence of brucellosis in Mexico in adult bovine cattle is 9%, although the frequency of infection in female calves is unknown. So far, only one author has mentioned that the incidence among female calves may range from 2.5% to 9%.⁵

Cows that are infected after an abortion or delivery eliminate the bacteria, which are then transmitted to other cows through contact with the placenta, vaginal discharges, fetuses and fetal liquids. The cow and its detritus thus become sources of infection.⁶

In a study it was found that bacterial concentration of *B. abortus* in the umbilical cords of two fetuses from different disease-positive cows was 4.3×10^9 ufc/g and 1.4×10^{13} ufc/g.⁷ These microorganisms may survive and propagate through food and water. In conditions of high humidity, low temperature and low sun intensity, *B. abortus* may remain viable during several months in water, aborted fetuses, manure, hay, work tools and clothes. It also resists desiccation in dust and soils, particularly in the presence of organic material.^{2,5,8,9}

Even though the presence of post-partum or post-delivery signs is not frequent in brucellosis-infected bovines, most of these animals become potential carriers and continue eliminating *Brucella* in milk, colostrum and uterine discharges in succeeding deliveries.^{2,5,8-12}

The infection seen in the uterus may remain latent in female calves during their first months of life. The animal may remain serologically negative until its first delivery, which is when it will begin to eliminate the bacterium. This is why congenital infections, or infection in the first months of life, represent significant

Introducción

La brucelosis bovina es causante de grandes pérdidas económicas debido principalmente a los abortos en el último tercio de la gestación, disminución en la producción de leche, desecho anticipado del hato, nacimiento de becerras débiles y nacimiento de becerras aparentemente normales, pero positivas a *Brucella abortus*. En México esta enfermedad se encuentra difundida en todos los estados, únicamente la parte norte del estado de Sonora se encuentra libre de ella.¹⁻³

En México, de acuerdo con un trabajo previo,⁴ la prevalencia de brucelosis en ganado bovino adulto es de 9%, pero se desconoce la frecuencia de la infección en becerras. A la fecha, solamente un autor cita que la incidencia en becerras puede variar desde 2.5% hasta 9%.⁵

Las vacas infectadas después de un aborto o de un parto eliminan la bacteria, la cual se transmite a otras vacas a través del contacto con placenta, descargas vaginales, fetos y líquidos fetales, por lo que la vaca y sus detritus se convierten en fuentes de infección.⁶

De acuerdo con un estudio, la concentración bacteriana de *B. abortus* en los cordones umbilicales en dos fetos de diferentes vacas positivas a la enfermedad fue de 4.3×10^9 ufc/g y de 1.4×10^{13} ufc/g.⁷ Estos organismos pueden sobrevivir y propagarse por medio de los alimentos y el agua. En condiciones de humedad alta, temperaturas bajas y de baja intensidad solar, la *B. abortus* puede permanecer viable durante meses en el agua, fetos abortados, estiércol, heno, materiales de trabajo y la ropa, pudiendo resistir la desecación en polvo y suelo, especialmente en presencia de material orgánico.^{2,5,8,9}

En los bovinos infectados de brucelosis no es frecuente que se presenten signos después del aborto o parto, pero la mayoría de estos animales se convierten en portadores potenciales y continúan eliminando *Brucella* en la leche, calostro y en las descargas uterinas en partos posteriores.^{2,5,8-12}

risks, since they act as reservoirs and potential sources of infection in the animal's reproductive life.¹³

Some studies have mentioned that in developed countries, where there is strict adhesion to vaccination regulations, without the possibility of paying for compensations for the elimination of disease-resistant bovines, prevalence rates over 20% are frequently seen in dairy herds.^{1,14}

The objective of this study was to determine the prevalence of brucellosis in female calves born to brucellosis-positive cows that had not been vaccinated against *B. abortus* within their first week of life and at three months of age, in order to compare it with that of calves born to brucellosis-negative cows. Diagnosis was established with the card and radial immunodiffusion (RID) tests with native haptén.

Material and methods

The study was performed in the state of Querétaro from January to June 2010 in two dairy herds of Holstein cows.

Herd 1, with 670 cows in production and a brucellosis control program, had a seroprevalence of 21.6% (145/670) positive cows, diagnosed by means of the card and RID tests. Samples from the coccygeal vein were taken from 80 dry cows to obtain serum. The serum was then frozen for collective analysis. Once all the samples were collected, they were thawed at room temperature for the card and RID tests. The card test at a cell concentration of 8% was used as screening test.¹⁵ RID with native haptén¹⁵ was used as confirmatory test, since it makes it possible to distinguish vaccine antibodies from antibodies due to infection with *Brucella*.^{16,17} Diagnostic tests were undertaken at the Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID) in Animal Microbiology of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Two blood samples were taken from the jugular vein of the female calves: the first one, on the second and seventh days of life and the second one, at 91 and 120 days of age. The latter before their complete dose vaccination with *B. abortus* strain S19. In the first 6 hours of life, all the calves were fed 4 L of non-pasteurized colostrum, regardless whether or not having been born to *Brucella*-positive or -negative cows. The animals were kept in open-air hutches until weaned, at 90 days of age on average.

Herd 2, with 1800 cows in production, was participation in the National Campaign against Animal Brucellosis promoted by the Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (NOM-041-ZOO-1995)¹⁵ starting January 2009. Based on the reports issued during the cam-

La infección que se presenta en el útero puede permanecer latente en las becerras durante los primeros meses de vida; el animal puede permanecer serológicamente negativo hasta su primer parto, momento en el que comienza a eliminar la bacteria. Es por ello que las infecciones congénitas, o en los primeros meses de vida, representan riesgos relevantes debido a que actúan como reservorios y fuentes potenciales de infección en su vida reproductiva.¹³

Algunos estudios mencionan que en países en desarrollo, que cumplen estrictamente con las normas de vacunación y en donde no existe la posibilidad de pagar indemnizaciones por la eliminación de bovinos resistentes a la enfermedad, se presentan con alta frecuencia hatos lecheros que muestran tasas de prevalencia mayores a 20%.^{1,14}

El objetivo de este estudio fue conocer la prevalencia de brucelosis en becerras no vacunadas contra *B. abortus* en la primera semana de vida y al tercer mes de edad, nacidas de vacas positivas, para compararla con la de becerras nacidas de vacas negativas, empleando para su diagnóstico las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial (IDR) con haptén nativo.

Material y métodos

El estudio se realizó en el estado de Querétaro de enero a junio de 2010 en dos hatos de bovinos lecheros de la raza Holstein.

El hato 1, con 670 vacas en producción y un programa de control de brucelosis, tenía una seroprevalencia de 21.6% (145/670) de vacas positivas, diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e IDR. Se tomaron muestras de la vena coccígea de 80 vacas secas para la obtención de suero, el cual se congeló para realizar el análisis colectivo. Una vez reunidas todas las muestras, se descongelaron a temperatura ambiente y se llevaron a cabo las pruebas de tarjeta e IDR. La prueba de tarjeta al 8% de concentración celular se utilizó como tamiz.¹⁵ La prueba de IDR con haptén nativo¹⁵ se empleó como prueba confirmatoria, ya que permite la distinción entre anticuerpos vacunales y anticuerpos presentes por la infección con *Brucella*.^{16,17} Las pruebas de diagnóstico se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID) de Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Se tomaron dos muestras sanguíneas de la vena yugular de las becerras; la primera entre los días 2 y 7 de vida y la segunda entre los días 91 y 120 de edad, ésta última antes de su vacunación con dosis completa de cepa S19 de *B. abortus*. Dentro de las primeras 6 h de vida, todas las becerras fueron alimentadas con 4 L de calostro no pasteurizado, indistintamente si

paign, a seroprevalence of 1.94% was detected in cows (35/1800) by means of the card and rivanol tests. Due to the low disease prevalence in this herd, a retrospective study was carried out, using the official registers of 1170 female calves from the campaign, which included the card and rivanol tests performed with the sera of animals younger than 3 months of age from January 2009 to June 2010.

DNA extraction from the isolates and reference strains was carried out with the phenol-chloroform method described by Sambrook *et al.*¹⁸. The extracted DNA (100 ng) was used as a mold for the PCR. To differentiate *B. abortus* strain S19 from field isolates, the initiators described by Sangari *et al.*¹⁹ were used. To eliminate the possible presence of *B. abortus* strain RB51, the initiators described by Vemulapalli *et al.*²⁰ were used.

Results

Herd 1 consisted of groups of brucellosis-positive and brucellosis-negative cows. Cows that had given birth to a live female calf were selected. In the group of positive cows, 22 female calves were born, out of which 6/22 (27.3%) were positive to the card test in their first week of life, whereas only 2/22 (9.1%) turned out to be positive using the RID test. At three months of age, these 6 same calves yielded positive with the card test and the same two yielded positive with the RID test (TABLE 1).

Likewise, 22 female calves were born to the group of negative cows, out of which 6 (27.3%) were positive to the card test in their first year of life, while none were positive to the RID test. In the third month of life, 8/22 (36.4%) calves yielded positive to the RID test (TABLE 1). Based on these results, 20 samples of milk were collected from the cooling tanks in different days, from which milk to feed the cows was obtained. The milk samples were inoculated in Farrell's agar and *Brucella* agar for isolation, and the obtained isolates were identified with biochemical tests by means of violet crystal dye and agglutination with acriflavine to determine if their phenotype was rough or smooth. DNA was extracted from the obtained isolates. The DNA from *B. abortus* strains 544, and vaccine strains RB51 and S19 (PRONABIVE), previously cultured in *Brucella* agar at 37°C for 72 h, was used as reference.

To differentiate *B. abortus* strain S19 from field strain isolates, PCR was used to amplify a 361-bp product and a product of 1063 for the remaining strains. On the other hand, to eradicate the possible presence of *B. abortus* strain RB51, a 1298-pb product was amplified, while a 456-pb product was amplified in the case of other strains.

procedían de vacas positivas o negativas a *Brucella*. Los animales fueron alojados en becerrerías de intemperie hasta su destete, en promedio, a los 90 días de edad.

El hato 2, con 1 800 vacas en producción, se encontraba inscrito en la campaña nacional contra la brucelosis en los animales, promovida por la Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (Sagarpa) (NOM-041-ZOO-1995)¹⁵ a partir de enero de 2009. Con base en los informes emitidos durante la campaña, se detectó una seroprevalencia de 1.94% en vacas (35/1800) mediante las pruebas de tarjeta y rivanol. Debido a la baja prevalencia de la enfermedad en este hato, se decidió realizar un estudio retrospectivo utilizando los registros oficiales de 1 170 becerras de la campaña, que incluían las pruebas de tarjeta y rivanol llevadas a cabo con los sueros de los animales menores de 3 meses de edad desde enero de 2009 hasta junio de 2010.

La extracción de ADN de los aislados y las cepas de referencia se realizó por el método de fenolcloroformo, descrita por Sambrook *et al.*¹⁸ El ADN extraído (100 ng) se utilizó como molde para la PCR. Para diferenciar la cepa S19 de *B. abortus* de los aislados de campo se utilizaron los iniciadores descritos por Sangari *et al.*¹⁹, y para eliminar la posibilidad de la presencia de la cepa de *B. abortus* RB51, se usaron los iniciadores descritos por Vemulapalli *et al.*²⁰

Resultados

En el hato 1 se conformaron grupos de vacas positivas y de vacas negativas; de cada uno se seleccionaron las vacas que habían parido una cría hembra viva. Así, en el grupo de vacas positivas nacieron 22 becerras, de las cuales 6/22 (27.3%) resultaron positivas a la prueba de tarjeta en la primera semana de vida, mientras que mediante la prueba de IDR sólo 2/22 (9.1%) becerras resultaron positivas. Al tercer mes de vida, las mismas 6 becerras resultaron positivas mediante la prueba de tarjeta y las mismas dos becerras salieron positivas mediante la prueba de IDR (CUADRO 1).

De manera similar, en el grupo de vacas negativas nacieron 22 becerras, de las cuales 6 (27.3%) resultaron positivas a la prueba de tarjeta en la primera semana de vida, mientras que mediante la prueba de IDR no se registró ninguna becerro positiva. Al tercer mes de vida, 8/22 (36.4%) becerras resultaron positivas a la prueba de tarjeta, mientras que sólo se encontraron 4/22 (18.2%) becerras positivas mediante la prueba de IDR (CUADRO 1). Con base en estos resultados, en diferentes días se recolectaron 20 muestras de leche de los tanques de enfriamiento, de los cuales se obtenía la leche para la alimentación de las becerras; las muestras de leche fueron inoculadas en agar Farrell y agar

CUADRO 1

Positividad a brucelosis en becerras de una semana y de tres meses de vida, nacidas de vacas positivas o negativas, con base en las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en un hato con seroprevalencia de 21.6% (145/670) de vacas brucelosas

Positivity to brucellosis in one-week-old and three-month-old female calves, born to disease-positive or -negative cows, based on results from the card and radial immunodiffusion tests in a herd with a seroprevalence of 21.6% (145/670) in cows with brucellosis.

Group of cows	Cows n	Calves n	Calves in the first week of life		Calves in the third month of life	
			Card	RID	Card	RID
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Positive	22	22	6 (27.3)	2 (9.1)	6 (27.3)	2 (9.1)
Negative	22	22	6 (27.3)	0 (0.0)	8 (36.4)	4 (18.2)

Isolation of *B. abortus*, identified as a field strain was obtained in 100% (20/20) of the cultured samples.

In herd 1, of 44 sampled female calves born to positive or negative mothers, 6 female calves were found to be positive to *B. abortus* using the RID test. The prevalence rate was 13.6%.

In herd 2, based on the National Campaign against Animal Brucellosis, 1170 registers were obtained of female calves of less than 3 months of age, out of which 24 yielded positive to *B. abortus* with the card and rivanol tests. This amounted to a prevalence of 20.5%. There were no results for the RID test.

Discussion

Because high sensitivity is a characteristic of the card test, it was used as the official screening test in the National Campaign against Animal Brucellosis, legally based on NOM-041-ZOO-1995. Nevertheless, this test is not reliable to differentiate vaccine antibodies or antibodies passively acquired through colostrum from those caused by the disease.^{5,15,17}

In a study carried out by Aparicio *et al.*,¹⁴ the use of the card test, together with the RID test, was proposed as screening test to considerably improve the ability to distinguish vaccine antibodies from antibodies produced by the infection. In this study it was observed that in herd 1, the group of female calves born to *B. abortus*-positive mothers, 6 (27.3%) turned out to be positive in their first week of life and in the third month of age when using the card test, while the RID test only yielded two positive results (9.1%) in disease-positive female calves of one week of life and three months of age. It may be stipulated that the card test classified 4 calves (18.2%) as false positives with respect to the RID test.

Brucella para el aislamiento, y los aislados obtenidos fueron identificados por pruebas bioquímicas mediante la tinción con cristal violeta y la aglutinación con acriflavina, para determinar su fenotipo: rugoso o liso. Se realizó la extracción de ADN de los aislamientos obtenidos y se utilizó como referencia el ADN de las cepas de *B. abortus* 544 y de las cepas vacunales RB51 y S19 (PRONABIVE), que habían sido cultivadas previamente en agar *Brucella* a 37°C durante 72 h.

Para diferenciar la cepa S19 de *B. abortus* de los aislados de campo, con la PCR se amplifica un producto de 361 pb y un producto de 1063 para las demás cepas, y para eliminar la posibilidad de la presencia de la cepa de *B. abortus* RB51, se amplifica un producto de 1298 pb y un producto de 456 pb cuando se trata de cualquier otra cepa.

El aislamiento de *B. abortus*, identificado como cepa de campo, se obtuvo en el 100% (20/20) de las muestras cultivadas.

En el hato 1, de una población total de 44 becerras muestreadas, nacidas de madres positivas o negativas, en los primeros tres meses de vida se encontraron 6 becerras positivas a *B. abortus* mediante la prueba de IDR, con una tasa de prevalencia de 13.6%.

En el hato 2, con base en la campaña nacional contra la brucelosis en los animales, se obtuvieron 1 170 registros de becerras menores de 3 meses de edad, de las cuales 24 becerras resultaron positivas a *B. abortus* mediante las pruebas de tarjeta y rivanol, lo cual equivale a una prevalencia de 2.05%. No se contó con los resultados de la prueba de IDR.

Discusión

La prueba de tarjeta se ha caracterizado por tener una alta sensibilidad, por lo que fue la prueba de tamiz ofi-

In the group of female calves born to *B. abortus*-negative mothers, 6 (27.3%) were positive in the first week of life, as were 8 (36.4%) using the card test. With the RID test, no calf yielded positive results during the first week of life, although 4 (18.2%) did so at three months of age. It may be concluded that the card test classified 6 (27.3%) and 4 (18.2%) calves as false positive in their first week of life and third month of age, respectively, when compared to the use of the RID test. The OIE² has stated that ruminants do not usually present signs after their first abortion due to *B. abortus* and that they may become potential carriers when continuing to eliminate *Brucella* through their milk and uterine discharges during subsequent births.¹¹ In a study carried out by Aparicio *et al.*¹⁴ in a bovine herd with brucellosis, 6 (17.1%) out of 35 cows in production yielded positive to the RID and ELISA-competitive assays. In these cows, *B. abortus* biotype 1, field strain, was isolated in milk. Isolating the *B. abortus* field strain in from the cooling tanks where the calves obtained their feed, makes it possible to hypothesize that female calves born to negative mothers were infected when consuming non-separated and non-pasteurized milk from disease-positive mothers.

Crawford *et al.*⁷ mention in their study that bacterial concentration in the umbilical cord of two fetuses from different *B. abortus*-positive cows was 4.3×10^9 bacteria/g and 1.4×10^{13} bacteria/g, constituting a source of infection for other calves born in the same place. Another possible means of infection is through the staff in charge of deliveries, since, in the case of this herd, there were no farrowing pens, no staff and no materials for negative cows as opposed to the case of positive cows.

It might be that a larger number of calves from the disease-negative cows acquired the infection within the first three months of life, compared to the group of positive cows, which was protected by the antibodies present in the colostrum.

The diagnosis of brucellosis at early ages is not made in Mexico; therefore, calves that are born or infected during lactation go unnoticed until they reach a reproductive age, which is when all the cattle in some herds undergoes serologic testing. In other herds tests are performed in case of abortions, and there are herds in which there is no interest at all in diagnosing the disease. These are some of the circumstances that hinder the control and eradication of brucellosis.

In conclusion, it is necessary to diagnose this disease in female calves from stables where brucellosis is present, in order to prevent leaving disease-positive animals in the herd, whose infection will be concealed by post-vaccine antibodies. The infection will then manifest itself in abortions during their first pregnancy, thus perpetuating the infection in the stable.

cial de la campaña nacional contra la brucelosis en los animales y está fundamentada legalmente en la NOM-041-ZOO-1995. Sin embargo, la prueba no es confiable para diferenciar los anticuerpos vacunales o los pasivamente adquiridos por medio del calostro, de los anticuerpos causados por la enfermedad.^{5,15,17} En un estudio realizado por Aparicio *et al.*¹⁴ se menciona que utilizar una prueba diagnóstica de tamiz como la de tarjeta, aunada a la prueba de IDR, mejoraría considerablemente la capacidad de distinguir los anticuerpos vacunales de los anticuerpos causados por la infección. En este estudio, en el hato 1 se puede observar que en el grupo de becerras nacidas de madres positivas a *B. abortus*, 6 (27.3%) resultaron positivas en la primera semana de vida y al tercer mes de edad con la prueba de tarjeta, mientras que la prueba de IDR sólo dio 2 resultados positivos (9.1%) en becerras positivas de una semana de vida y también al tercer mes de edad. Se puede establecer que la prueba de tarjeta clasifica a 4 becerras (18.2%) como falsos positivos con respecto a la prueba de IDR.

En el grupo de becerras nacidas de madres negativas a *B. abortus*, 6 (27.3%) resultaron positivas en la primera semana de vida y 8 (36.4%) al tercer mes de edad con la prueba de tarjeta; con la prueba de IDR ninguna becerro resultó positiva en la primera semana de vida, pero 4 (18.2%) fueron positivas al tercer mes de edad. Se puede concluir que la prueba de tarjeta clasificó a 6 (27.3%) y 4 (18.2%) becerras como falsos positivos en la primera semana de vida y al tercer mes de edad, respectivamente, con respecto a la prueba de IDR. La OIE² menciona que los rumiantes generalmente no presentan signos después de su primer aborto por *B. abortus*, y que pueden convertirse en portadores potenciales al continuar eliminando *Brucella* en la leche y en las descargas uterinas durante los partos posteriores.¹¹ En un estudio realizado por Aparicio *et al.*¹⁴ en un hato bovino con brucellosis, de 35 vacas en producción, 6 (17.1%) resultaron positivas a las pruebas de IDR y ELISA-competitivo, de estas vacas se logró el aislamiento en leche de *B. abortus* biotipo 1, cepa de campo. En el presente estudio, al lograr el aislamiento de *B. abortus* cepa de campo de los tanques de enfriamiento de donde se obtenía el alimento de las becerras, se puede plantear la hipótesis de que las becerras nacidas de madres negativas se infectaron al consumir la leche de madres positivas, que no se separaba ni se pasteurizaba.

En un estudio realizado por Crawford *et al.*⁷ se menciona que la concentración bacteriana de los cordones umbilicales de dos fetos de diferentes vacas positivas a *B. abortus* fue de 4.3×10^9 bacterias/g y de 1.4×10^{13} bacterias/g, lo cual representa una fuente de infección para otras becerras que nazcan en el mismo lugar. La otra forma de posible infección es a través del personal

This premise has been demonstrated in this study carried out in a dairy stable, where the prevalence was 21.6% and the presence of *Brucella abortus* was proved by isolating field strains. It was demonstrated that of 22 female calves born to brucellosis-positive cows, 2 calves (9.1%) were seropositive in their first week of life after being tested with a high-specificity assay such as RID. These calves yielded positive again at three months of age before being vaccinated with S19. Additionally, the 22 calves that were daughters of seropositive cows were found to be seronegative in the sampling obtained during their first week of life. However, 4 of them (18.2%) were seropositive when tested with the RID test at three months of age due to the high presence of *Brucella* in the herd.

Acknowledgements

Special thanks to MVZ Tomás Merás Nevares for his technical support in the experimental stage of this study.

References

1. FLORES CR. Bases científicas en el uso de vacunas contra la brucelosis. Memorias del 4° Curso internacional de medicina productiva en bovinos lecheros; 2010 abril 22-24; Juriquilla (Querétaro) México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, 2010:85-90.
2. OIE, College of Veterinary Medicine Iowa State University-The Center Food Security & Public Health 2009. Brucellosis. Serial online: año mes] [Cited: 2011 February 10]. Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucellosis.pdf>.
3. HERRERA E, PALOMARES G, DÍAZ AE. Milk production increase in a dairy farm under a six-year brucellosis control program. Ann N Y Acad Sci 2008; 1149:296-299.
4. LÓPEZ MA, PÉREZ MAE. Seroepidemiology of brucellosis in Mexico. Salud Pública de México 1992; 34:230-240.
5. RADOSTITS OM, BLOOD DC, GAY CC. Veterinary Medicine. 10th ed. London: Balliere Tindall, 2007.
6. ENRIGHT FM, NIELSEN K, DUNCAN JR. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. Boca Raton (FL): CRC Press, 1990.
7. CRAWFORD RP, ADAMS LG, FICHT TA, TEMPLETON JW, WILLIAMS JD. Effects of stage of gestation and breed on bovine responses to vaccination with *Brucella abortus* strain 19. J Am Vet Med Assoc 1991; 199:887-891.
8. CHEVILLE NF, MCCULLOUGH DR, PAULSON LR. Brucellosis in the Greater Yellowstone Area. Washington, DC: National Research Council; 1998:25.
9. OLSEN S, TATUM F. Bovine brucellosis. Vet Clin Food Anim Pract 2010; 26:15-27.

que atiende los partos, ya que en ese hato no se contaba con paridero, ni con personal ni con materiales para vacas negativas, distintos del de vacas positivas.

Posiblemente un mayor número de becerras en el grupo de vacas negativas adquirió la infección en los primeros tres meses de vida con respecto al grupo de las vacas positivas, que estaban protegidas por los anticuerpos presentes en el calostro.

En México no se realiza el diagnóstico de brucelosis a edades tempranas, por consiguiente las becerras que nacen o que se infectan en la etapa de lactancia pasan desapercibidas hasta que llegan a la edad reproductiva, cuando se realizan pruebas serológicas a todo el ganado en algunos hatos; en otros, sólo se realizan pruebas si abortan, y hay hatos en los que no se tiene ningún interés por diagnosticar la enfermedad. Éstas son algunas de las circunstancias por las que se dificulta el control y erradicación de la brucelosis.

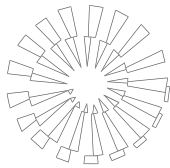
Se concluye que: es necesario realizar el diagnóstico de esta enfermedad en las becerras de establos con presencia de brucelosis, para evitar dejar animales positivos en el hato, cuya infección se ocultará con los anticuerpos posvacunales, y se manifestará al presentar aborto durante su primera gestación, perpetuando así la infección en el establo. Esta premisa se demuestra en el presente estudio realizado en un establo lechero con una prevalencia de 21.6% y con presencia de *Brucella abortus* comprobada mediante el aislamiento de cepas de campo. En él se demostró que de 22 becerras nacidas de vacas positivas a brucelosis, 2 becerras (9.1%) resultaron seropositivas a la semana de vida usando una prueba con elevada especificidad como la IDR, las mismas becerras se volvieron a presentar positivas a los tres meses de vida antes de la vacunación con S19. Adicionalmente, en las 22 becerras hijas de vacas seronegativas se encontró que eran seronegativas en el muestreo a la semana de edad, pero 4 de ellas (18.2%) se volvieron seropositivas a la prueba de IDR a los tres meses de vida debido a la elevada presencia de *Brucella* en el hato.

Agradecimientos

Se agradece al MVZ Tomás Merás Nevares por su apoyo técnico en la parte experimental de este estudio

10. BICKETT WD, TREVINO I. Biological risk management, an overview. 2010. Memorias del 4° Curso internacional de medicina productiva en bovinos lecheros; 2010 abril 22-24; Juriquilla (Querétaro) México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, 2010:5-13.
11. OLSEN SC, THOEN CO, CHEVILLE NF, GYLES CL, THOEN CO, PRESCOTT JF *et al.* *Brucella*. Pathogenesis

- of bacterial infections of animals. Ames (IA): Blackwell Publishing, 2004.
12. ROOP RM, GEE JM, ROBERTSON GT, RICHARDSON JM, NG WL, WINKLER ME. *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57:57-76.
 13. BUSTAMANTE SJ, SALAZAR HF, DÍAZ AE, MANZANO CC, PÉREZ GR, HERNÁNDEZ AL. Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*. *Téc Pec Méx*. 2000; 38:35-42.
 14. APARICIO BA, DÍAZ AE, HERNÁNDEZ AL, PÉREZ GR, ALFONSECA SE, SUAREZ GF. Serological and bacteriological evaluation of a bovine herd infected with brucellosis and revaccinated with a reduced dose of *Brucella abortus* strain 19. *Téc Pec Méx* 2003; 41(2):129-140.
 15. DOF. "Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales" Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. Diario Oficial de la Federación 20 agosto 1996.
 16. DÍAZ AE, HERNÁNDEZ AL, VALERO EG. Diagnóstico de brucelosis animal. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2001.
 17. ALTON GG, JONES LM, ANGUS RD. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: Institute National de la recherche e agronomique; 1988.
 18. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning. Laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 19. SANGARI FJ, GARCIA-LOBO JM, AGUERO J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett* 1994b Sep 1;121(3):337-42.
 20. VEMULAPALLI R, MCQUISTON JR, SCHURIG GG, SRIRANGANATHAN N, HALLING SM, BOYLE SM. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999 Sep;6(5):760-4.



Caracterización de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* en exudado faríngeo de bovinos productores de carne clínicamente sanos en el estado de Querétaro

Characterization of capsular types of *Pasteurella multocida* isolated from clinically healthy beef cattle pharyngeal exudate in the state of Querétaro

Ana Lilia Villegas Vázquez† Víctor Manuel Campuzano-Ocampo* Rigoberto Hernández-Castro**
Francisco Suárez-Güemes*** Francisco José Trigo Tavera† Carlos Julio Jaramillo-Arango‡

Abstract

The objective of the present study was to identify and characterize capsular types of *P. multocida* isolated from beef cattle pharyngeal exudate in the state of Querétaro. Two hundred and twenty seven pharyngeal exudate swab samples from clinically healthy animals in a slaughterhouse in the municipality of Ezequiel Montes, Querétaro were obtained. Samples were seeded in blood agar and incubated at 37°C for 24 h under aerobiosis. Strains were identified through morphological characteristics, conventional biochemical tests and commercial API 20NE Micro-System. Capsular typing of groups A and D was performed by a multiplex PCR for amplification of genes *hyaD-hyaC* and *dcbF*, respectively. According to the values established by API WEB software, it was possible to identify 14.09% (32/227) of *P. multocida* strains, which showed an identification percentage of 96% and a typicality of 1 to *P. multocida*. By multiplex PCR, the amplification of genes *hyaD-hyaC*, correspondent to capsular group A in 100% (32/32) of the strains previously identified as *P. multocida*, was achieved. There are no similar data in Mexico on the identification and characterization of *P. multocida* in beef cattle. With the results obtained it is confirmed that, in a similar way with other countries of Europe and America, capsular type A of *P. multocida* is predominant in Mexico.

Key words: *PASTEURELLA MULTOCIDA*, CAPSULAR TYPES, BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION, PHARYNGEAL EXUDATE, CATTLE, PCR.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar los tipos capsulares de *P. multocida* en exudado faríngeo de bovinos destinados a la producción de carne en el estado de Querétaro. Se obtuvieron, mediante hisopo, 227 muestras de exudado faríngeo de animales clínicamente sanos en una planta de sacrificio ubicada en el municipio de Ezequiel Montes, Querétaro. Las muestras se sembraron en agar sangre y se incubaron a 37°C por 24 h en aerobiosis. Las cepas aisladas fueron identificadas mediante características morfológicas, pruebas bioquímicas convencionales y el micro sistema comercial API 20NE. La tipificación de los grupos capsulares A y D se realizó por medio de una PCR múltiple para la amplificación de los genes *hyaD-hyaC* y *dcbF*, respectivamente. De acuerdo con los valores establecidos por el software API WEB, se logró la identificación de 14.09% (32/227) de cepas de *P. multocida*, que mostraron 96% de identidad y una tipicidad de 1 a *P. multocida*. Por medio de la PCR múltiple se logró la amplificación de los genes *hyaD-hyaC* correspondientes al grupo capsular A en el 100% (32/32) de las cepas identificadas previamente como *P. multocida*. No existen datos similares en

Recibido el 19 de junio de 2013 y aceptado el 4 de septiembre de 2013.

*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

**Dirección de Investigación, Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Secretaría de Salud, Av. Calzada de Tlalpan 4800 Col. Sector XVI, 14080, México, D.F.

***Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

†Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

‡Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano CEIEPAA, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Km. 8.5 Carretera Tequisquiapan, Ezequiel Montes, Tequisquiapan, Querétaro.

Autor de correspondencia: Carlos Julio Jaramillo Arango, Correo electrónico: jaramillo50@yahoo.com.mx Tel. 014142918100

Nota: Este trabajo es parte de la tesis de licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia del primer autor.

México sobre la identificación y caracterización de *P. multocida* en bovinos destinados a la producción de carne. Con los resultados obtenidos se corrobora que, de manera similar a otros países de Europa y América, en México el grupo capsular predominante de *P. multocida* es el A.

Palabras clave: *PASTEURELLA MULTOCIDA*, TIPOS CAPSULARES, CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, EXUDADO FARÍNGEO, BOVINOS, PCR.

Introducción

Bovine respiratory disease complex (BRD) consists of three clinical entities: enzootic pneumonia of calves, interstitial pneumonia and pneumonic pasteurellosis in cattle; this last is described as an acute course disease that affects young and adult cattle, in which microorganisms of the Pasteurellaceae family, such as: *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* and *Histophilus somni* are involved, as well as other agents, such as infectious bovine rhinotracheitis virus (IBR), among others.^{1,2}

The main pathogens present in BRD are part of the normal microbiota of the respiratory tract in beef cattle. *P. multocida* is one of the main microorganisms isolated from BRD, as well as *M. haemolytica*. When stressful conditions or viral infections exist, these microorganisms normally colonize the nasopharynx of several domestic and wild animals.^{3,4}

P. multocida is subdivided into four subspecies, which include *Pasteurella multocida* subspecies *multocida*, *gallicida*, *septica* and *tigris*. *P. multocida* can be classified into five capsular groups: A, B, D, E and F, based on different polysaccharides of the capsule.⁵⁻⁷

The geographic distribution of these groups varies, groups B and E cause hemorrhagic septicemia that affects the water buffalo and cattle in Asia, Africa and south of Europe. It has been demonstrated that capsular groups A and D affect cattle in Mexico. Prevalence determination contributes to the elaboration of biological products for prevention and control of pneumonic pasteurellosis.^{6,7}

The diagnosis of diseases caused by *P. multocida* has been traditionally based on identification of clinical signs and physiochemical characteristics of the agent. These tests are carried out based on phenotypic qualities; however, culture conditions may have an influence on the expression of some characteristics, such as morphology, carbohydrate fermentation and serological properties and therefore decrease the sensitivity and specificity of the methods based on these characteristics.⁸

In recent years, molecular biological techniques have given great benefits for bacterial identification overcoming the limitations of conventional procedures. The assays based on the detection of nucleic acids enable the detection of organisms directly from

Introducción

El complejo respiratorio bovino (CRB) está conformado por tres entidades clínicas: neumonía enzootica de los terneros, neumonía intersticial y la pasteurellosis neumónica bovina; ésta última se describe como una enfermedad de curso agudo que afecta a los bovinos jóvenes y adultos, en la cual se involucran microorganismos de la familia Pasteurellaceae, como *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni* y otros agentes como el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), entre otros.^{1,2}

Los principales patógenos presentes en el CRB son parte de la microbiota normal de las vías respiratorias de los bovinos de engorda. *P. multocida* es uno de los principales microorganismos aislados dentro del CRB, al igual que *M. haemolytica*. Estos microorganismos colonizan normalmente la nasofaringe de diversos animales domésticos y silvestres, cuando existen condiciones de tensión (estrés) o bien en infecciones virales.^{3,4}

P. multocida se subdivide en cuatro subespecies, que incluye a *Pasteurella multocida* subs *multocida*, *gallicida*, *septica* y *tigris*. *P. multocida* se puede clasificar en cinco grupos capsulares: A, B, D, E y F, basándose en los diferentes polisacáridos de la cápsula.⁵⁻⁷

La distribución geográfica de estos grupos es variable, los grupos B y E producen la septicemia hemorrágica, que afecta a los búfalos de agua y al ganado bovino en Asia, África y sur de Europa. Se ha demostrado que los grupos capsulares A y D afectan al ganado bovino en México. La determinación de la prevalencia contribuye a la elaboración de productos biológicos para la prevención y control de la pasteurellosis neumónica.^{6,7}

El diagnóstico de las enfermedades producidas por *P. multocida* se basa en los signos clínicos y características fisicoquímicas del agente. Estas pruebas se realizan con base en cualidades fenotípicas; sin embargo, las condiciones del cultivo pueden influir en la expresión de algunas características, como la morfología, fermentación de carbohidratos y propiedades serológicas, y con ello disminuir la sensibilidad y especificidad de los métodos basados en estas características.⁸

En años recientes, las técnicas de biología molecular han significado grandes beneficios para la identificación bacteriana, superando algunas limitaciones de los procedimientos convencionales. Los ensayos basados en la detección de los ácidos nucleicos permiten la de-

clinical samples and thus sensitivity, specificity and time required for identification of the microorganism improves. PCR, in particular, has been useful, because by using specific primers it is easy to identify the genus and the capsular groups.^{8,9}

In Mexico there are previous studies on characterization and prevalence of *P. multocida* capsular types in dairy cattle, but none have been carried out in beef cattle; therefore, the objectives of this study were to identify the different capsular types and estimate the frequency of *Pasteurella multocida* in clinically healthy beef cattle pharyngeal exudate.

Material and methods

Sampling design

A prevalence of 18% was considered based on previous studies¹⁰ and the minimum sample size (MSS) was calculated with 95% confidence and 5% estimated error.

The following equation was used: $n = z^2 \times p \times q / d^2$, in which $z = 95\%$ confidence level = 1.96; p = probability that an event or prevalence will occur; $q = 1 - p$, probability that an event will not occur; d = estimated error. Based on this equation, 227 bovines was the MSS for obtaining the ratio of animals positive for *P. multocida*.

Collection and type of study samples

Bovines were sampled at the slaughterhouse of the Distribuidora de Carne del Bajío (DICABSA), located in the municipality of Ezequiel Montes, Querétaro; these animals were sampled after slaughter and before washing. Pharyngeal exudate samples were collected using sterile swabs, placed in Stuart's transport medium and kept in refrigeration until processing at the Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública Veterinaria in the Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, FMVZ-UNAM.

Isolation and identification of *P. multocida*

Isolation and identification of colonies was carried out by inoculation of blood agar plates from pharyngeal exudate swabbings; they were incubated under aerobiosis for 24 hours at 37°C. Later, Gram staining was performed. The morphological characteristics of the colonies were observed and those consistent with *P. multocida* were selected: round, gray, mucoid and without hemolysis. Catalase and oxidase identification tests were conducted. A new inoculation was performed

tección de organismos directamente de las muestras clínicas, así se mejora la sensibilidad, la especificidad y el tiempo requerido para la identificación del microorganismo. Particularmente la PCR ha sido muy útil, pues con el uso de iniciadores específicos resulta fácil la identificación del género y los grupos capsulares.^{8,9}

No obstante que en México se cuenta con estudios previos sobre la caracterización y prevalencia de los tipos capsulares de *P. multocida* en bovinos destinados a la producción de leche, aún no se han realizado estudios en bovinos destinados a la producción de carne; por tal motivo, los objetivos de este estudio fueron: identificar los diferentes tipos capsulares y estimar la frecuencia de *Pasteurella multocida* en exudado faríngeo de bovinos clínicamente sanos destinados a la producción de carne.

Material y métodos

Diseño del muestreo

Se consideró una prevalencia de 18% con base en estudios previos¹⁰ y se calculó el tamaño mínimo de muestra (TMM) con 95% de confianza y un error estimado de 5%.

Se aplicó la siguiente ecuación: $n = z^2 \times p \times q / d^2$, en la que z = nivel de confianza al 95% = 1.96; p = probabilidad de que ocurra el evento o prevalencia; $q = 1 - p$, probabilidad de que no ocurra el evento; d = error estimado. Con base en dicha ecuación, el TMM fue de 227 bovinos, para determinar la proporción de animales positivos a *P. multocida*.

Obtención y tipo de muestras de estudio

La obtención de las muestras se llevó a cabo en la planta de sacrificio tipo inspección federal (TIF) de la Distribuidora de Carne del Bajío (DICABSA), ubicada en el municipio de Ezequiel Montes, Querétaro, en bovinos provenientes del mismo municipio; dichos animales fueron muestreados después del sacrificio y antes del lavado de las cabezas. Se recolectaron muestras de exudado faríngeo mediante hisopos estériles que se colocaron en medio de transporte Stuart y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento, el cual se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública Veterinaria y en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, FMVZ- UNAM.

with the aim to obtain strains of pure *P. multocida* culture and then, biochemical identification was performed using a commercial microsystem.

Biochemical identification of *P. multocida*

Biochemical identification of *P. multocida* strains was carried out using the API 20NE system.* The colonies, incubated for 18 to 24 hours in 5% blood agar, were tested. The reaction reading was carried out using the identification table provided by the manufacturer; identification was done with a numerical profile and recognition by using the online identification software (APIWEB).

Molecular characterization of capsular groups of *P. multocida*

DNA extraction

The strains identified as *P. multocida* by the API20NE system were re-seeded on to 5% blood agar and incubated at 37°C for 24 hours. DNA extraction was done by the thermal shock method.¹¹ A loop of bacterial sample was suspended in 200 µl of distilled sterile water and was subjected to a temperature of 92°C (boiling) for 15 minutes. It was centrifuged at 8000 × g for 15 minutes and 5 µl of supernatant (DNA) were added to the PCR mix.

PCR

The amplified genes for characterization of capsular types were: for A, *hyaD-hyaC* encoding the synthesis of hyaluronic acid by means of primers 5'-TGCCA-AAATCGCAGTCAG-3' and 5'-TTGCCATCATTGT-CAGTG-3' and for capsular group D, *dcbF* encoding the synthesis of a glycosyl transferase of the capsular operon, for which the primers used were: 5'-TTACA-AAAGAAAGACTAGGAGCCC-3' and 5'-CATCTACCACTCAATATCAG-3'. Molecular characterization was done by multiplex PCR based on the protocol described by Campuzano *et al.*⁸ Amplification was done in a thermocycler* under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by denaturation at 95°C for 30 seconds, elongation at 56.5°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds using 30 cycles; final extension at 72°C for 5 minutes. The reactions were kept at 4°C until visualization. For the reactions to occur, 32.5 µl of distilled sterile water, 5 µl 1 x PCR buffer, 3 µl of MgCl₂, 2 µl of dNTPs, 0.5 µl of each primer, 5 µl of DNA and 0.5 µl

Aislamiento e identificación de *P. multocida*

El aislamiento e identificación de las colonias se realizó por siembra en cajas de agar sangre a partir del hisopo, se incubaron en aerobiosis durante 24 h a 37°C. Posteriormente se realizó la tinción de Gram. Se observaron las características morfológicas de las colonias y se seleccionaron aquellas que coincidieron con las de *P. multocida*: redondas, grises, mucoides y sin presencia de hemólisis. Posteriormente se llevaron a cabo las pruebas de identificación de catalasa y oxidasa. Se realizó una nueva siembra con el fin de obtener cultivo puro de las cepas de *P. multocida*, y posteriormente se llevó a cabo la identificación bioquímica mediante un microsistema comercial.

Identificación bioquímica de *P. multocida*

Se realizó la identificación bioquímica de las cepas de *P. multocida* mediante el sistema API 20NE*. Las pruebas se efectuaron a partir de colonias incubadas durante 18 y hasta 24 h en agar sangre al 5%. La lectura de las reacciones se realizó utilizando la tabla de identificación provista por el fabricante, la identificación se hizo con un perfil numérico, y el reconocimiento, mediante el software de identificación en línea (APIWEB).

Caracterización molecular de los grupos capsulares de *P. multocida*

Extracción de ADN

Las cepas identificadas como *P. multocida* mediante el sistema API 20NE se sembraron en agar sangre al 5% y se incubaron a 37°C durante 24 h. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el método de choque térmico.¹¹ Se suspendió una asada de la muestra bacteriana en 200 µl de agua destilada estéril, la cual se sometió a una temperatura de 92°C (ebullición) durante 15 minutos. Se centrifugó a 8000 g durante 15 minutos y se tomaron 5 µl del sobrenadante (ADN) para agregarlos a la mezcla de la PCR.

PCR

Para la caracterización de los tipos capsulares, los genes amplificados para el A fueron: *hyaD-hyaC*, que codifican para la síntesis de ácido hialurónico por medio de los iniciadores 5'-TGCCAAAATCGCAGTCAG-3'

*BioMérieux sa F-69280 Marcy l'Etoile, Francia.

of Taq DNA polymerase were added. After amplification, the products were analyzed on 1% agarose gels stained with ethidium bromide at 10% (10 mg/ml).

Results

Morphological identification of *P. multocida* strains

Of the 227 processed samples, 77 isolates recovered (33.92%) corresponded to *P. multocida* morphology (round, gray, mucoid and without hemolysis). Subsequently, they were Gram stained and 54 colonies (23.78%) corresponded to Gram-negative coccobacilli. Finally, oxidase and catalase tests were performed, resulting 50 positive isolates (22.02%).

Biochemical identification of strains by API 20NE

The 50 isolates, catalase positive and oxidase positive, were subjected to API 20NE microsystem for obtaining definitive biochemical identification with the following results: 64% (32/50) showed 96% of identification and typicality of 1 to *P. multocida*, and 24% (12/50) corresponded to *Pasteurella* spp, with an identification and typicality lower than 96% and 1, respectively.

Molecular typing

Genes *hyaD-hyaC* were amplified for capsular group A using PCR and gene *dcbF* for group D, whose amplification products had an expected molecular weight of 1044 bp for group A and 657 bp for group D (FIGURE 1). By means of multiplex PCR, it was possible to amplify a product of ~1044 bp in 100% of the strains (n = 32) that correspond to capsular group A of *P. multocida* (FIGURE 2).

Frequency of *P. multocida* in clinically healthy beef cattle

Based on the results obtained in biochemical and molecular identification, the estimated frequency of *P. multocida* was 14.09% (32/227), of which 100% (32/32) were group A.

Discussion

Bovine respiratory disease complex has great economic importance in cattle. Its confirmation is difficult because of the variety of clinical signs and the diagnostic procedures may last long. Bacterial agents are

y 5'- TTGCCATCATTGTCAGTG- 3', y para el grupo capsular D, el gen amplificado fue *dcbF*, que codifica para la síntesis de una glicosil transferasa del operón capsular, para lo cual se emplearon los iniciadores 5'-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC-3' y 5'- CATC-TACCCACTCAATATCAG-3'. La caracterización molecular se realizó por medio de una PCR múltiple tomando como base el protocolo descrito por Campuzano *et al.*⁸ La amplificación se realizó en un termociclador* bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, elongación a 56.5°C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos por 30 ciclos. La extensión final a 72°C por 5 minutos. Las reacciones se mantuvieron a 4°C hasta su visualización. Se colocaron 32.5 µl de agua destilada estéril, 5 µl de amortiguador 1x PCR, 3 µl de MgCl₂, 2 µl de dNTP'S, 0.5 µl de cada uno de los iniciadores, 5 µl de ADN y 0.5 µl de Taq ADN polimerasa. La visualización de los productos amplificados se efectuó en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio al 10% (10 mg/ml).

Resultados

Identificación morfológica de las cepas de *P. multocida*

De un total de 227 muestras procesadas, se recuperaron 77 aislados (33.92%) que correspondieron a la morfología de *P. multocida* (redondas, grisáceas, mucoides y sin presencia de hemólisis). Posteriormente se realizó la tinción de Gram, en donde 54 colonias (23.78%) correspondieron a coccobacilos Gramnegativos. Finalmente se utilizaron las pruebas de oxidasa y catalasa, con las que resultaron 50 aislamientos (22.02%) positivos.

Identificación bioquímica de las cepas mediante API 20NE

Los 50 aislados que resultaron positivos a los ensayos de catalasa y oxidasa fueron sometidos al microsistema API 20NE para obtener la identificación bioquímica definitiva, con los siguientes resultados: 64% (32/50) mostró 96% de identificación y tipicidad de 1 a *P. multocida*, y 24% (12/50) correspondió a *Pasteurella* spp, con una identificación y tipicidad menores a 96% y 1, respectivamente.

*MAXYGENE 198 Cambridge Street, Wembley WA 6014, Australia.

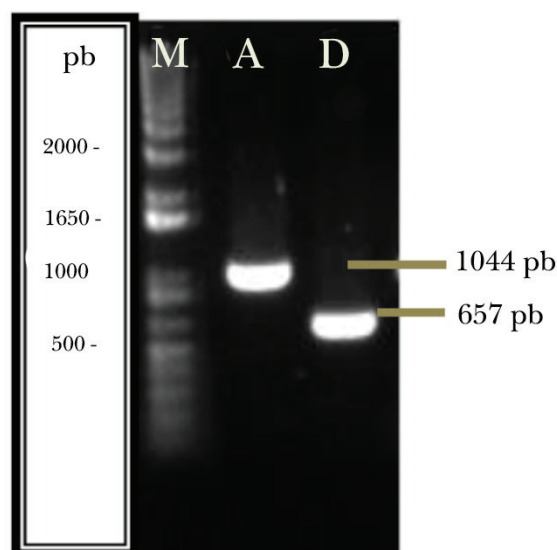


FIGURA 1. Producto de amplificación de PCR múltiple. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. (M) Marcador, (A) Cepa de referencia A, (D) Cepa de referencia D

FIGURE 1. Amplification product by multiplex PCR. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel. (M) Marker, (A) Reference strain A, (D) Reference strain D.

the pathogens most commonly involved; there is no effective and simple test to determine the etiology of the disease.^{1,11,12}

It has been demonstrated that the main bacteria found in respiratory problems in cattle are: *M. haemolytica*, *H. somni* and *P. multocida*, this last one is the bacterium most commonly isolated from pneumonia in dairy calves,^{14,15} which reflects, to some extent, the opportunist nature of the microorganism, overcoming the development of other bacteria.^{15,16}

Capsular groups A and D of *P. multocida* are responsible for causing pneumonic pasteurellosis in Mexico. In studies conducted in the country, it has been possible to isolate *Pasteurella* spp from lung samples obtained in slaughterhouses, in approximately 50% of the cases in which *P. multocida* has been the main causative agent identified.¹⁷⁻¹⁹

The diagnosis of *P. multocida* has been traditionally based on clinical signs and physicochemical characteristics of the agent. Tests are performed based on phenotypic characteristics; however, culture conditions may affect the expression of the bacterium properties and decrease specificity and sensitivity of methods based on these characteristics.

For biochemical identification of *P. multocida* there are methods based on miniaturized commercial systems that make typing easier and faster, among them is API 20NE, which is used as a tool for identification of Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from

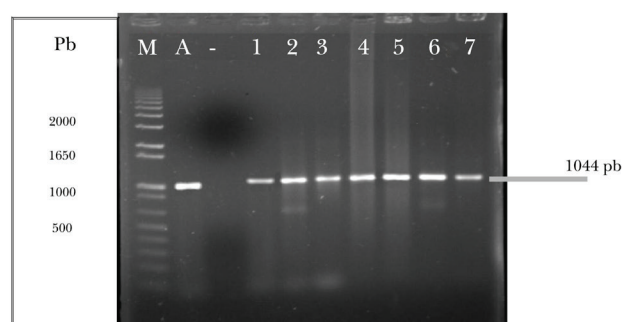


FIGURA 2. Producto de amplificación de PCR múltiple a partir de muestras de exudado faríngeo de bovinos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (M) Marcador, (A) Control positivo A, (-) Control negativo, carriles 1-7 cepas de campo

FIGURE 2. Amplification product by multiplex PCR from bovine pharyngeal exudate samples. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel. (M) Marker, (A) Positive control A, (-) Negative control, lanes 1 – 7: field strains.

Tipificación molecular

Mediante la prueba de PCR se amplificaron los genes *hyaD-hyaC* para el grupo capsular A, y el gen *dcfF* para el grupo D, cuyos productos de amplificación tuvieron un peso molecular esperado de 1044 pb para el grupo A y de 657pb para el grupo D (**FIGURA 1**). Por medio de la PCR múltiple se logró la amplificación de un producto de ~1044 pb en 100% de las cepas (n = 32), que corresponde al grupo capsular A de *P. multocida* (**FIGURA 2**)

Frecuencia de *P. multocida* en bovinos clínicamente sanos destinados a la producción de carne.

Con base en los resultados obtenidos en la identificación bioquímica y molecular, la frecuencia estimada de *P. multocida* fue de 14.09 % (32/227), de la cual el 100% (32/32) fue grupo A.

Discusión

El CRB ha sido reconocido como una enfermedad de gran importancia económica en el ganado. Su confirmación es difícil debido a la variedad en los signos clínicos y a que los procedimientos para su diagnóstico pueden tomar mucho tiempo. Los agentes bacterianos son los patógenos más comúnmente involucrados, actualmente no existe una prueba eficaz y sencilla para determinar la etiología de la enfermedad.^{1, 11,12}

Las principales bacterias encontradas en los problemas respiratorios en el ganado bovino son:

veterinary medical sources, with very satisfying results in *P. multocida* and *M. haemolytica* strains.¹⁹ The API system is able uniquely to identify *P. multocida* in 64% less time compared to other systems such as Oxi/Ferm. The percentage of identification errors is only 10% in *P. multocida* isolates.^{19,22}

In the results obtained by this system, a high percentage of identification and complete typicality to *P. multocida* was observed in 100% of the isolates. With the use of API 20NE system, it was possible to identify 32 strains (14.09%), such as *P. multocida*, which showed 96% of identification and typicality of 1; twelve strains (5.28%) with 96% of identification and typicality smaller than 1 were observed. The results of the biochemical profile of the strains studied in this work, with regard to the percentage of identification and typicality regarding *P. multocida*, coincide with the results obtained by Campuzano *et al.*,⁸ who in 97.5% of the strains analyzed found 96% of identification and typicality of 1, for which, API 20NE identification system is considered an easy method with high reliability for the identification of this microorganism.

It has been observed that detection of *P. multocida* is performed faster using PCR technique. With the identification of genes involved in the biosynthesis of capsular polysaccharides, the specific sequences of the capsular groups are identified as primers for capsular typing of *P. multocida*.²² The use of colony PCR technique or DNA boiling extraction method reduces the time it takes for typing without having to perform bacterial DNA extraction by more expensive and slower methods, as the case of alkaline lysis. PCR targeting the *hyaC-hyaD* gene provides specific detection of *P. multocida* strains.^{11,12}

The advantages of PCR compared with other tests include rapidness, sensitivity, specificity and simplicity. It does not need special culture mediums or inoculation of laboratory animals; therefore, it is safer because there is no need to handle live bacteria.¹¹

The frequencies of the present study (14.09%), of which 100% were identified as capsular group A, are similar to other authors that have identified group A in percentages that range from 80% to 100%.²² Similar studies have been conducted in sheep, calves and dairy cattle, in which capsular group A is the most frequently found with percentages that range from 77 to 97.3%;^{5,13} while in capsular group D, the interval ranges from 0.02 to 27%.^{21,23,24} Yates²⁵ mentions that type A is commonly associated with bovine pneumonia, while group D is sporadically found in cases of respiratory disease.

In other reports based on phenotypic characterization of *P. multocida* strains of bovine and some other ruminant origin, the predominant capsular group is A. Research carried out on pneumonic lung tissue samples

M. haemolytica, *H. somni* y *P. multocida*, ésta última se cita como la más comúnmente aislada en las neumonías de becerras de razas especializadas en la producción de leche,^{13,14} lo cual refleja, en alguna medida, la naturaleza oportunista de este microorganismo al superar el desarrollo de otras bacterias.^{15,16}

Se han identificado los grupos capsulares A y D de *P. multocida* como los responsables de la pasteurelosis neumónica en México. En estudios llevados a cabo en el país con muestras pulmonares provenientes de rastros, se han logrado aislamientos de *Pasteurella* spp en alrededor de 50% de los casos, en los que *P. multocida* ha sido el principal agente patógeno identificado.¹⁷⁻¹⁹

El diagnóstico de *P. multocida* se ha basado en la presencia de signos clínicos y la presentación de características fisicoquímicas del agente. Las pruebas se realizan con base en características fenotípicas; sin embargo, las condiciones de cultivo pueden influir en la expresión de las propiedades de la bacteria y con ello disminuir la especificidad y sensibilidad de los métodos basados en estas características.

Para la identificación bioquímica de *P. multocida* se dispone de métodos que se basan en microsistemas comerciales o miniaturizados, los cuales facilitan y agilizan la tipificación. Entre ellos se encuentra el sistema API 20NE, el cual se ha empleado como herramienta en la identificación de enterobacterias y no enterobacterias en medicina veterinaria, con resultados muy satisfactorios en cepas de *P. multocida* y *M. haemolytica*.¹⁹ El sistema API es capaz de identificar con precisión *P. multocida* en menos tiempo (64% menos), en comparación con otros sistemas como Oxi/Ferm. El porcentaje de errores de identificación es de sólo 10% en los aislamientos de *P. multocida*.²⁰⁻²¹

En los resultados obtenidos mediante el uso de este sistema se observó un alto porcentaje de identificación y tipicidad completa a *P. multocida* en 100% de los aislamientos. Al utilizar el sistema API 20NE se logró identificar 32 cepas (14.09%) como *P. multocida*, las cuales mostraron 96% de identificación y tipicidad de 1 a *P. multocida*; se observaron 12 cepas (5.28%) con porcentajes de identificación y tipicidad menores a 96% y 1, respectivamente. Los resultados obtenidos del perfil bioquímico de las cepas estudiadas en este trabajo, en cuanto al porcentaje de identificación y tipicidad con respecto a *P. multocida*, concuerdan con los obtenidos por Campuzano *et al.*,⁸ quienes en 97.5% de las cepas analizadas encontraron 96% de identificación y tipicidad de 1 a *P. multocida*, por lo cual se considera al sistema de identificación API 20NE como un método fácil de aplicar y de alta confiabilidad para el reconocimiento de este microorganismo.

Se ha observado que la detección de *P. multocida* se realiza en una menor cantidad de tiempo utilizando la técnica de PCR. Con la identificación de los genes

of Holstein calves in the Estado de México²⁴ and on pneumonic lung tissue in the Estado de México and Durango, reported the presence of group A in an interval that ranges from 98.7 to 100% of the samples studied and 1.2% for group D.^{19,24} Blanco *et al.*¹⁸ reported the presence of group A in 100% of *P. multocida* isolates from pneumonic lungs of calves in the Estado de México.

In the present study, the totality of *P. multocida* isolates correspond to capsular group A, these results show that this group predominates in clinically healthy beef cattle and they are similar to the results obtained by Campuzano *et al.*,⁸ where nasal exudate samples from clinically healthy dairy cattle from the Región Lagunera in the states of Coahuila and Durango and in the state of Hidalgo, were used, which corroborates that, similarly to other countries of Europe and America, in Mexico, the predominant capsular group of *P. multocida* is A.

Identification and characterization of capsular groups of *P. multocida* is important for prevention and treatment of pneumonic pasteurellosis in beef cattle. Also, it enables to increase knowledge of the epidemiological situation of this microorganism in the municipality of Ezequiel Montes, state of Querétaro. Similarly, it may contribute to the development of more efficient immunogens and as support in prevention and control programmes of this disease.

It is important to point out that there are no similar data in Mexico on identification and characterization of *P. multocida* in beef cattle.

Acknowledgements

Special thanks to Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología for the support received for Project CB104031, to Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública and to Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the UNAM, for the facilities granted for carrying out this study.

Referencias

1. COOPER VL, BRODERSEN BW. Bovine Respiratory Disease. Vet Clin North Am: Food Anim Pract 2010; 26:191-426.
2. LILIE LE. The Bovine Respiratory Disease Complex. The Canadian Veterinary Journal. Symposium on Immunization of Cattle Against the Common Diseases of the Respiratory Tract. Rev Vet Can 1974; 15:233-42.
3. JARAMILLO ACJ, TRIGO TFJ, SUÁREZ GF, Mannheimiosis Bovina: Etiología, Prevención y Control. Vet Méx 2009; 403:293-311.

implicados en la biosíntesis del polisacárido capsular, las secuencias específicas de los grupos capsulares identificadas se utilizan como iniciadores para la tipificación capsular de *P. multocida*.²² La PCR puede realizarse a partir de una colonia bacteriana o mediante la extracción de ADN por ebullición, lo que reduce el tiempo para la tipificación, sin necesidad de la extracción del ADN bacteriano por métodos más costosos o con mayor inversión de tiempo, como en el caso de la lisis alcalina. La PCR dirigida a los genes *hyaD* -*hyaC* proporciona una detección específica de las cepas de *P. multocida*.^{11,12}

Las ventajas de la PCR, en comparación con otras pruebas existentes, incluyen una mayor velocidad, sensibilidad, especificidad y simplicidad. No requiere medios de cultivo especiales ni la inoculación de animales de laboratorio y, por lo tanto, es más segura, ya que evita el manejo de bacterias vivas.¹¹

Las frecuencias del presente trabajo (14.09%), de las cuales el 100% fue identificada como grupo capsular A, son similares a las registradas por otros autores que han reconocido al grupo A en porcentajes que van de 80% hasta 100%.²² Trabajos similares se han realizado en ovinos, becerras y ganado lechero, en los que el grupo capsular más frecuentemente encontrado es el A, con porcentajes que van desde 77 hasta 97.3%,^{5,13} mientras que en el grupo capsular D el intervalo es de 0.02 hasta 27%.^{21,23,24} Yates²⁵ menciona que el tipo A está asociado comúnmente con la neumonía en bovinos, mientras que el grupo D sólo se encuentra esporádicamente en casos de enfermedad respiratoria.

En otros informes basados en la caracterización fenotípica de las cepas de *P. multocida* de origen bovino y otros rumiantes, el grupo capsular predominante es el A. Investigaciones realizadas en bovinos con muestras de pulmones neumónicos de becerras Holstein en el Estado de México,²⁴ y en pulmones neumónicos en el Estado de México y en Durango, informaron la presencia del grupo A en un intervalo de 98.7 a 100% de las muestras estudiadas y 1.2 % para el grupo D.^{19,24} Blanco *et al.*¹⁸ indicaron la presencia del grupo A en el 100% de los aislamientos de *P. multocida* en pulmones con lesiones neumónicas provenientes de becerras en el Estado de México.

En el presente estudio, la totalidad de los aislamientos de *P. multocida* corresponden al grupo capsular A, dichos resultados demuestran que este grupo predomina en los bovinos clínicamente sanos destinados a la producción cárnica y se asemejan a los resultados obtenidos en el trabajo de Campuzano *et al.*,⁸ en el que se utilizaron muestras de exudado nasal de bovinos lecheros clínicamente sanos procedentes de la Comarca Lagunera de los estados de Coahuila y Durango, y en el estado de Hidalgo, con lo cual se corro-

4. BOYCE RY, WILKIE I, ADLER B. *Pasteurella and Mannheimia* In: GYLES CL, PRESCOTT JF. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3rd ed. Iowa: Blackwell Publishing 2007; 1: 273-270.
5. VIDHYA M, CHANDRAN DJ, MANOBAR P, DHINAKAR R. Molecular identification of serogroups of *Pasteurella multocida* isolated from sheep by capsular PCR typing. J Vet Anim Sci 2007;3:140-143.
6. CUETO LM, PASCUAL HA. *Pasteurella multocida*. Departamento de microbiología. Hospital universitario Virgen Macarena. Sevilla. [En línea: 2013 enero] [Citado: 2013 enero 20]. Disponible en: <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/pmultocida.pdf>
7. BOYCE JD, JING YC, ADLER B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. J Biotechnol 2000; 83:153-160.
8. CAMPUZANO VM, GONZÁLEZ RAD, HERNÁNDEZ CR, SUÁREZ GF, TRIGO TFJ, JARAMILLO ACJ. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Pasteurella multocida* de exudado nasal en bovinos, en dos cuencas lecheras de México. Vet Méx 2011; 1:1-10.
9. BOYCE JD, CHENG JY, ADLER B. Genetic organization of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M104 (B:2). Vet Microbiol 2000; 72:121-34.
10. JARAMILLO ACJ, HERNÁNDEZ CR, SUÁREZ GF, MARTÍNEZ MJ, AGUILAR RF, JARAMILLO ML *et al*. Characterization of *Mannheimia* spp. strains isolated from bovine nasal exudate and factors associated with isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. Res Vet Sci 2008; 84: 7-13.
11. SZABO I, UDA H, SAKAMOTO H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. Clin Pathol 1994; 47:318-323.
12. RAJEEV G, KUMAR A, SINGH VP, VIJENDRA P, SINGH, T.K. DUTTA, SB. Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup-A isolates by PCR assay. Division of Bacteriology and Mycology, Indian Veterinary Research Institute, Veterinary science 2004; 76:179-185.
13. DE ROSA DC, MECHOR GD, STAATS JJ, CHENGAPPA MM. Comparison of *Pasteurella* spp simultaneously Isolated from Nasal and Transtracheal Swabs from Cattle with Clinical Signs of Bovine Respiratory Disease. Elanco Animal Health, Greenfield, Indiana 46140, 1 and Kansas State University. J Clin Microbiol 2000; 38:327-332.
14. GOURLAY RN, THOMAS LH, WYLD SG. Experimental *Pasteurella multocida* pneumonia in calves. Res Vet Sci 1989; 47:185-189.
15. VIRTALA AMK, MECHOR GD, GROHN YT, ERB HN, DUBOVI EJ. Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. J Am Vet Med Assoc 1996; 208:2035-2042.
16. AMES TR. Dairy calf pneumonia. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1997; 13:379-391.
17. TRIGO TF, HERNÁNDEZ LG, RAMÍREZ CC, BERRUECOS VM. Patología y bacteriología de

bora que, de manera similar a otros países de Europa y América, en México el grupo capsular predominante de *P. multocida* es el A.

La identificación y caracterización de los grupos capsulares de *P. multocida* es importante en la prevención y tratamiento de la pasteurelosis neumónica en bovinos destinados a la producción de carne, así como para conocer la situación epidemiológica de este microorganismo en el municipio de Ezequiel Montes, en el estado de Querétaro. De igual forma, puede contribuir al desarrollo de inmunógenos más eficaces y como apoyo en los programas de prevención y control de dicha enfermedad.

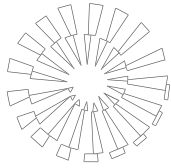
Es menester resaltar que no existen datos publicados en México sobre la identificación y caracterización de *P. multocida* en bovinos destinados a la producción de carne.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo recibido para el proyecto CB104031; al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública y al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

-
- pulmones neumónicos de becerros. Vet Méx 1982; 13:131-140.
 18. BLANCO-VIERA FJ, TRIGO FJ, JARAMILLO ML, AGUILAR RF. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. Rev Lat-Amer Microbiol 1995; 37:121-126.
 19. JARAMILLO ACJ, HERNANDEZ CR, CAMPUZANO OV, SUÁREZ GR, DELGADO GR, TRIGO TF. Characterization of *Mannheimia* sp and *P. multocida* strains isolated from bovine pneumonic lungs in two slaughterhouses in Mexico. J Anim Vet Adv 2007; 12:1384-1403.
 20. DABO SM, DEBEY BM, MONTELONGO M, CONFER W. Genomic DNA restriction site heterogeneity in bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates detected with rRNA probe. J. Med Microbiol 1999; 48: 279-286.
 21. COLLINS MT, WEAVER N, ELLIS RP. Identification of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* by API 20NE, Minitek and Oxy/ferm Systems. J Clin Microb 1981; 13:433-437.
 22. TOWNSEND KM, BOYCE JD, YENG CJ, FROST AJ, ADLER B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR Typing System. J Clin Microbiol 2001; 39:924-929.

23. DE LA ROSA RJL, JARAMILLO ACJ, MARTÍNEZ MJJ, AGILAR RF, HERNÁNDEZ CR, SUÁREZ GF *et al.* Frecuencia de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* en becerras con signos clínicos de enfermedad respiratoria, en un complejo lechero del estado de Hidalgo, México. Vet Méx 12; 43:1-10.
24. JARAMILLO CL, AGUILAR RF, TRIGO TF. Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* aisladas de pulmones neumónicos de becerros en México. Vet Méx 1987; 18:185-188.
25. YATES WDG. A review of infectious bovine rhynotracheitis, shipping fever pneumonia and viralbacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can J Comp Med 1982; 46:225-263.



Inactivación del metacestodo de *Taenia solium* a través del proceso de compostaje: Una realista alternativa aplicable en el medio rural en México

Metacestode of *Taenia solium* inactivation by composting: a feasible alternative in rural areas of Mexico

Habacuc Esquivel* Nelly Villalobos* Alejandro Vargas*** José Juan Martínez Maya**

Abstract

Cysticercosis by *Taenia solium* metacestode affects pigs, giving ground for meat confiscation. Composting is an alternative disposition method for confiscated carcasses and other animal debris, inactivating and destroying pathogens in the carcasses. In this study, composting was evaluated as a method to inactivate *T. solium* metacestodes. Seven compost cone-shaped piles were built, and three depth-zones were defined within them. Each zone was divided into 4 subzones, and a portion of contaminated meat was introduced into each subzone. Meat was sampled at 24, 36, 48, and 72 h and tested for evagination *in vitro*. The maximum required time for cysticercus inactivation was 48 h. Meat was incorporated to compost after 7 days. No significant differences were found in cysticercus inactivation among the compost zones ($P > 0.05$), but significant differences were found with respect to the outside. Therefore, all zones were regarded equally effective to inactivate viable *T. solium* cysticerci.

Key words: COMPOSTING, INACTIVATION, METACESTODE, *T. SOLIUM*.

Resumen

La cisticercosis causada por el metacestodo de la *Taenia solium* afecta al cerdo y es causa de decomiso obligatorio. La composta es un medio alternativo para depositar decomisos y otros desechos animales, ya que inactiva y destruye patógenos presentes en canales. En el presente estudio se evaluó el compostaje para la inactivación de metacestodos de *T. solium*. Para ello se construyeron siete pilas de composta en forma de cono, divididas según su profundidad en tres zonas y cada una en cuatro partes, donde se colocó carne contaminada. Se realizaron muestreos a las 24, 36, 48 y 72 h, y se sometieron a la prueba de evaginación *in vitro*. El tiempo máximo para la inactivación total de los cisticercos fue de 48 h. La carne quedó incorporada a la composta desde los 7 días. No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la inactivación de cisticercos en los distintos niveles de las compostas, pero sí con respecto al exterior, por lo que se consideró efectiva cualquier zona para la inactivación de cisticercos de *T. solium* viables.

Palabras clave: COMPOSTAJES, INACTIVACIÓN, METACESTODO, *T. SOLIUM*.

Recibido el 27 de agosto del 2013 y aceptado el 15 de enero de 2014.

*Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F.

**Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F.

***Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) -Jilotepec. FMVZ. Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F.

Responsable de correspondencia: Dra. Nelly Villalobos. Tel 00525556225958, correo electrónico: nelly@unam.mx

Este trabajo es parte de la tesis de licenciatura del primer autor.

Introduction

Cysticercosis is caused by the metacestode, or larval form of *Taenia solium* and may affect human and pig tissues.¹ The life cycle of *T. solium* includes the pig as the intermediate host.¹ Therefore, pig carcasses with metacestodes should not be consumed, and in case of being confiscated, they must be stored in containers for subsequent disposal; however, waste often exceeds the container capacity, for which mishandling of organic material left inside may be a challenge.

In order to monitor waste materials, composting organic waste has been suggested. This process is economic and has low impact when used as a method for destruction of confiscated cysticercosis-infected pig carcasses, in any municipal slaughterhouse of the country.

In recent years, the composting process has been used as routine carcass disposal/management and in cases of high mortality rate in poultry and pig farms, where it has been identified as preferred method for carcass disposal in farms.² Although many surveys have been focusing on pathogen destruction by composting, little attention has been paid to its appreciable efficacy in destroying causative agents of parasitic diseases.³

Aerobic composting is the biological process that generates a biochemical reaction which releases heat, carbon dioxide and water vapour,^{4,5} where interaction of several bacterial, fungus and actinomyces species co-exists, facilitating biochemical changes that transform raw organic waste materials.⁶ In turn, the population of these microorganisms appear in cyclic succession according to the environmental conditions in the compost pile, such as: temperature, moisture content, porosity and pH.⁵ Thus, cyclic microbial succession is promoted with the aim to decompose the organic material into more simple nutrients, where thermal change plays an important role for the establishment of microorganism population and its destruction.⁷

Due to increased temperature during the composting process, the majority of viruses and bacteria present in the raw organic materials are destroyed, but metacestode and other parasitic larval stage inactivation has not been proved totally effective.⁸

Compost is a stable odorless and humus-like material that is formed by decomposed animal and vegetable matter, has no environmental health risk and high social acceptance. Therefore, the objective of this study was to evaluate the inactivation of *T. solium* cysticerci while being exposed to different temperatures during the composting process.

Introducción

La cisticercosis es causada por el metacestodo o forma larvaria de la *Taenia solium* y puede afectar a diferentes tejidos del organismo del hombre y del cerdo.¹ El cerdo es el huésped intermediario para mantener el ciclo de *T. solium*.¹ Por tal motivo, las canales de cerdo con metacestodos no deben ser consumidas, y en caso de ser decomisadas, deben almacenarse en contenedores para desecharlas posteriormente; sin embargo, muchas veces los desechos sobrepasan la capacidad de los contenedores, por lo que puede hacerse un mal manejo del material orgánico que queda en ellos.

Para controlar una adecuada eliminación se ha propuesto el proceso de compostaje a base de material orgánico. Este proceso es económico y de bajo impacto cuando se usa como método para la destrucción de canales de cerdo decomisadas en cualquier rastro municipal del país por estar contaminadas con cisticercos.

En los últimos años, el proceso del compostaje se ha utilizado para el manejo rutinario de eliminación de canales y en casos de mortalidad elevada en granjas de aves y cerdos, donde se ha identificado como el método preferido para la disposición de los cadáveres en granjas.² Aunque la destrucción de los patógenos a través de la composta ha sido el foco de muchas investigaciones, se ha puesto poca atención a su eficacia para destruir a los agentes causantes de enfermedades parasitarias.³

El compostaje de tipo aeróbico es el proceso biológico que genera una reacción bioquímica que libera calor, bióxido de carbono y vapor de agua,^{4,5} en donde coexiste una interacción de diversas especies de bacterias, hongos y actinomicetos que facilitan los cambios bioquímicos que transforman la materia prima compostada.⁶ A su vez, las poblaciones de estos microorganismos se presentan en una sucesión cíclica de acuerdo con las condiciones del medio dentro de la pila en la composta, como la temperatura, humedad, porosidad y el pH.⁵ De esta manera, se promueve una sucesión microbiológica cíclica con la finalidad de descomponer la materia orgánica hacia nutrientes más simples, donde los cambios térmicos juegan un papel fundamental para el establecimiento de las poblaciones de microorganismos y su destrucción.⁷

Debido al incremento de temperatura durante el proceso de compostaje se destruye a la gran mayoría de virus y bacterias presentes en la materia prima compostada, pero la efectividad de la inactivación de cestodos y otras fases larvarias de parásitos no han quedado totalmente comprobadas.⁸

La composta es un material inodoro, estable y parecido al humus, que se forma por la descomposición

Material and methods

This study was carried out at the Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the UNAM. Seven compost cone-shaped piles with a height of 40 cm and 90 cm in diameter were formed with 22.5 kg of pig manure, 22.5 of ground pine bark, 22.5 kg of ground grass (particles with a range of diameters between 10 and 20 mm) and 60 L of water. Pine and grass were mixed with pig manure until generating a homogeneous mixture. Water was gradually added to obtain a homogeneous mixture of ingredients and water level, with 70% of humidity. Based on its depth, the cone was divided into three zones: zone 1, located on the top; zone 2, located at the central part and zone 3, located at the bottom, 10 cm from the base, each one separated by approximately 10 cm. Also, the circumference (seen from above) was divided into quadrants (A, B, C and D).

Ten kg of experimentally infected meat with cysticerci, cut into cubes of approximately 300 g, were put in each zone of the compost piles. To keep track of the metacestode destruction percentage, four plastic bins (one for each quadrant) with lids and bottom grid-like pattern were also placed, containing 10 metacestodes each, giving a total of 12 plastic bins per compost. Each bin was fixed by means of a wire guide for its identification and easy removal at the moment of sampling. Also, four control assay tubes with 10 viable cysticerci and with 2 ml of physiological saline solution (PSS) were used as controls and were placed outside the compost pile.

For temperature evaluation (°C) in different composting process stages, a digital infrared thermometer was used. Temperature was taken at 24, 36, 48 and 72 hours, at days 7, 14, 21, 28, 35 and 42 after the ingredient mixture was made (IM). Also, a hydrometer* was used to record the compost moisture level (ML).

A plastic bin was removed from each quadrant at 24, 36, 48 and 72 hours, as well as the control assay tubes from this quadrant. In order to determine viability of cysticerci, 0.85% of physiological saline solution and 10:1 pig bile concentration were used, mixed in a Petri dish that was placed in an electric culture oven* for 24 hours at 37°C; after that time, those cysticerci that evaginated and showed movement were considered alive and with infective capacity.

The chi-square test was used to analyze the results.⁹ The Kolmogorov-Smirnov test⁹ was used for temperature analysis, with the objective to determine whether or not data presented a normal distribution; therefore, the ANOVA method was used to compare the temperatures of the zones in which the compost piles were di-

de materiales animales y vegetales, no presenta riesgo sanitario para el medio ambiente y tiene una aceptación social elevada. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la inactivación que presentan los cisticercos de *T. solium* al permanecer expuestos a las diferentes temperaturas que se presentan durante el proceso de compostaje.

Material y métodos

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se construyeron 7 pilas de composta en forma de cono con una altura de 40 cm y un diámetro de 90 cm; cada una se formó con 22.5 kilos de excretas de porcino, 22.5 kilos de madera de pino molido, 22.5 kilos de pasto molido (con partículas de un tamaño de entre 10 a 20 mm) y 60 litros de agua. Se mezclaron el pino y el pasto con los sólidos de excretas porcinas hasta generar una mezcla homogénea. El agua se adicionó gradualmente para que la mezcla de los ingredientes y el nivel de agua fueran homogéneos con 70% de humedad. Con base en su profundidad, el cono se dividió en tres zonas: zona 1, localizada en la parte superior; la zona 2, ubicada en la parte central y la zona 3, localizada en la parte inferior a 10 cm de la base, cada una separada aproximadamente 10 cm. Además, la circunferencia (vista desde arriba) se dividió en cuadrantes (A, B, C y D).

En cada una de las zonas se colocaron 10 kilogramos de carne de cerdo infectado experimentalmente con cisticercos, cortada en trozos de aproximadamente 300 gramos. Para contabilizar el porcentaje de destrucción de los metacestodos, se colocaron además cuatro cajas de plástico (una para cada cuadrante) con tapa y base en forma de rejilla, las cuales contenían 10 metacestodos cada una, dando un total de 12 cajas de plástico por composta. Cada caja se fijó con una guía de alambre para su identificación y fácil retiro al momento de los muestreos. Además, se utilizaron cuatro tubos de ensayo con 10 cisticercos viables y con 2 ml de solución salina fisiológica (SSF), los cuales sirvieron como testigos y se ubicaron afuera de la pila de la composta.

Para la evaluación de la temperatura (°C) en las diferentes etapas del proceso de compostaje, se utilizó un termómetro infrarrojo digital. Se tomó la temperatura a las 24, 36, 48 y 72 horas, a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días posteriores al mezclado de los ingredientes (MI). También se utilizó un higrómetro* para registrar el nivel de humedad (HR) contenido dentro de las pilas de composta.

*G.I.S. Ibérica HR001, España

vided. Data were processed using the GraphPad InStat 3® statistics software.

Results

Survival of metacestodes. With respect to treatment time, it was observed that during the first 24 hours there was no difference in survival rate; however, at 36, 48 and 72 hours, evagination rates were higher in cysticerci found at the outside of the compost piles ($P < 0.05$) (Table 1).

Seven days after the start of the composting process, metacestodes were not evaluated because the meat was already incorporated to the compost materials (liquefaction process).

At 24 hours it was observed that cysticerci from the three zones of the compost, as well as controls, showed 40% of evagination in the superficial and intermediate zones, 52% in the deep zone and 62% in control group. There were no significant differences ($P > 0.05$).

At 36 hours, a decreased evagination rate from 10 to 19% was observed in the three internal zones. Contrary to the control group, which showed 62% of evagination.

At 48 hours, only 4% of metacestodes from the compost evaginated in the superficial zone, while metacestodes from the control group showed 38% of evagination. ($P < 0.05$).

At 72 hours, only 2% of cysticerci evaginated in the superficial zone, while 12% of evaginated metacestodes from the control group was determined in this zone. Results were processed using GraphPad InStat 3® statistics software.

Temperature. In the first 72 hours of the experiment, a similar trend in the three zones of the compost pile (48.5 to 49.1°C) was observed, different from the temperature of the pile's exterior (35.8°C) ($P < 0.05$), which always remained below the levels reached in the pile (Table 2).

Se sacó una caja de plástico de cada cuadrante a las 24, 36, 48 y 72 horas, así como el tubo con los testigos de ese cuadrante. Para determinar la evaluación de la viabilidad de los cisticercos se utilizó solución salina fisiológica al 0.85% y bilis de cerdo en una concentración 10:1, mezclados en una caja de Petri, la cual se colocó en una estufa de cultivo eléctrica* por 24 horas a 37°C, después de ese tiempo se consideraron vivos y con capacidad infectiva aquellos cisticercos que evaginaron y que presentaban movimiento.

Los resultados se analizaron mediante una prueba de Ji-cuadrada.⁹ Para el análisis de las temperaturas se utilizó la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov⁹ con el fin de determinar si los datos presentaban o no una distribución normal, por ello se utilizó el método de ANDEVA para comparar las temperaturas de las zonas en que se dividieron las pilas de composta. Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico GraphPad InStat 3®.

Resultados

Sobrevivencia de los metacestodos. Con respecto al tiempo de los tratamientos, se observó que a las primeras 24 horas no hubo diferencia en la proporción de supervivencia; sin embargo, a las 36, 48 y 72 horas, las proporciones de evaginación fueron mayores en los cisticercos encontrados en el exterior de las pilas de composta ($P < 0.05$) (CUADRO 1).

Después de siete días del inicio del proceso de compostaje no se evaluaron los metacestodos debido a que la carne ya estaba incorporada a los materiales de la composta (proceso de licuefacción).

Se observó que a las 24 horas, los cisticercos de las tres zonas de la composta, así como los testigos, presentaron 40% de evaginación en las zonas superficial e intermedia, 52% en la zona profunda y 62% en el grupo testigo. En ningún caso hubo diferencia significativa ($P < 0.05$).

*Riossa MON, México

CUADRO 1

Proporción de evaginaciones de metacestodos de *Taenia solium* a diferentes profundidades y tiempos
Evagination rate of scolices in *Taenia solium* metacestodes at different depths and times

Evagination	24 h		36 h		48 h		72 h	
	evagination	rate/total	evagination	rate/total	evagination	rate/total	evagination	rate/total
Superficial	0.40a	21/52	0.10a	5/52	0.04a	2/52	0.02a	1/52
Intermediate	0.40a	21/52	0.12a	6/52	0.00a	0/52	0.00a	0/52
Deep	0.52a	27/52	0.19a	10/52	0.00a	0/52	0.00a	0/52
External	0.62a	32/52	0.62b	32/52	0.38b	20/52	0.12b	6/52

Only a difference between temperatures was recorded at 24 hours in the three decomposition zones with respect to subsequent samplings ($P < 0.05$), which showed a similar temperature trend in the three zones. In the first four samplings, the periods in which higher composting temperatures occur correspond to the interval between 36 and 48 hours (Table 2), also the period during which lower rate of evagination in metacestodes occurs in the compost pile ($Z1 = 4\%$, $Z2 = 0\%$ and $Z3 = 0\%$). Temperature samplings at days 7, 14, 21, 28, 35 and 42 showed that in the composting process, the following stages were observed: mesothermal ($10 - 40^{\circ}\text{C}$), thermophilic ($40 - 75^{\circ}\text{C}$), cooling (less than 40°C) and maturity or curing (20°C or less).

Discussion

No similar studies evaluating the inactivation or destruction process of *T. solium* cysticerci by temperatures generated during composting have been found.

The results obtained in the present study may be compared with what was described by Nava *et al.*,¹⁰ who used the cooking process for cysticerci inactivation, in which resistance of *T. solium* metacestodes was evaluated, and it was found that deep frying of contaminated pieces of meat no more than 5 cm thick, for at least one hour, inactivates the cysticercus.¹⁰ Likewise, prolonged cooking in water on the boiling point of contaminated pork meat fragments (no more than 5 cm thick), for two hours, inactivates the metacestodes; additionally, they also found that inactivation is generated at cooking temperatures of 80°C for 15 minutes, in meat about 4 cm thick.

In the present study it was observed that the period of intense cysticerci inactivation occurs between 36 and 48 hours, when there is only 4% of evagination in the superficial zone and none in the intermediate and deep zone, which is associated with the temperature reached inside the compost pile during that same period ($Z1 = 47.7^{\circ}\text{C}$, $Z2 = 48.9^{\circ}\text{C}$ and $Z3 = 48.4^{\circ}\text{C}$).

A las 36 horas, hubo una disminución de 10 a 19% en la proporción de evaginaciones en las tres zonas internas. Contrario al grupo testigo, que presentó 62% de evaginación ($P < 0.05$).

A las 48 horas, sólo en la zona superficial evaginó un 4% de los metacestodos de compostas, mientras que los metacestodos del grupo testigo presentaron 38% de evaginación ($P < 0.05$).

A las 72 horas, sólo 2% de los cisticercos de la zona superficial evaginaron, en tanto que de los metacestodos del grupo testigo evaginaron el 12% ($P < 0.05$). Los resultados fueron procesados mediante el paquete estadístico GraphPad InStat 3®.

Temperatura. Durante el periodo correspondiente a las primeras 72 horas del experimento, se observó una tendencia similar en las tres zonas del cono de composta (48.5 a 49.1°C), las cuales fueron diferentes a la temperatura exterior de la pila 35.8°C ($P < 0.05$), que siempre se mantuvo por debajo de los niveles alcanzados dentro del cono (CUADRO 2).

Sólo se registró diferencia entre las temperaturas registradas a las 24 horas en las tres zonas de la composta con respecto a los muestreos posteriores ($P < 0.05$), los cuales presentaron una tendencia de temperatura similar para las tres zonas. En los cuatro primeros muestreos se observa que los periodos durante los que se presenta una mayor elevación de la temperatura corresponden al intervalo de las 36 a las 48 horas (CUADRO 2), periodo durante el cual también ocurre el menor porcentaje de evaginaciones de los metacestodos dentro de las pilas de composta ($Z1 = 4\%$, $Z2 = 0\%$ y $Z3 = 0\%$). Los muestreos de temperatura de los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42, mostraron que en el proceso de compostaje se observaron las siguientes etapas: mesotérmica ($10-40^{\circ}\text{C}$), termofílica ($40-75^{\circ}\text{C}$), enfriamiento (menos de 40°C) y maduración o curado (20°C o menos).

CUADRO 2

Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) de compostas a diferentes profundidades y tiempos
Compost temperature ($^{\circ}\text{C}$) at different depths and times

Depth	24 hours	36 hours	48 hours	72 hours
Superficial	42.5 ^{aa}	44.5 ^{aa}	47.7 ^{aa}	49.1 ^{aa}
Intermediate	43.4 ^{aa}	46.3 ^{aab}	48.9 ^{ab}	48.5 ^{ab}
Deep	42.4 ^{aa}	44.2 ^{abab}	48.4 ^{ab}	48.6 ^{ab}
External	21.2 ^{ba}	34.5 ^{bb}	32.4 ^{bb}	35.8 ^{bb}

Temperature differences at the same time at different depths, with different italic letters in each respective column ($P < 0.05$).

Temperature differences in different sampling periods with different bold letters in each respective line ($P < 0.05$).

The results obtained in this study with respect to temperature, show higher levels during the first 72 hours after the composting process has started and they are similar to the obtained in 2007 by Wilkinson² while using poultry carcasses that had died from influenza, where temperatures higher than 60°C within the first five days were recorded; in that study, the inactivation of pathogens (influenza virus) was demonstrated and it was observed that the smaller the particle the faster will decompose and temperature will increase inside the compost pile.

In the present study, the temperature of the compost piles decreased from day 14 to 21. Similar results are described by Wilkinson,² in 2007; Christesten *et al.*,³ in 2002 and Sánchez A, in 2011, who observed that temperature begins to drop from days 14 to 20 after the beginning of the process, for which they suggest that the materials of the compost be mixed again, avoiding the presence of sublethal zones (areas in which there is no adequate pathogen inactivation). The relative humidity (RH) recorded during the experiment always remained higher than 60%, which according to Liang *et al.*,⁵ is considered to be the best for the development of the composting process of solid waste. Jones and Martin¹¹ report that green-waste composting efficiently eliminates the majority of pathogens, as long as a temperature of 55°C is maintained for at least three days.

Composting is not the best mechanism for elimination of contaminated carcasses, especially in places where they are equipped with the infrastructure to use other procedures; however, it could be an effective alternative particularly in places where there are no incinerators, or it is not possible to use other procedures such as cooking, especially due to high parasitic load that sometimes is observed in carcasses, mainly in rural zones and because costs would probably not allow its implementation; therefore, carcass disposal would remain a challenge in the continuity of the biological cycle.

Acknowledgements

Special thanks is given to Dr, María Elena Trujillo for the facilities provided for carrying out this work, EMVZ Myriam Sánchez for the support given for carrying out the biological test and to the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), DGAPA project IT-214311 and PAPIIT project IN226611 for their financial support.

Referencias

1. LARRALDE C, ALUJA AS. Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. México DF: Secretaría de

Discusión

No se encontraron estudios similares que evalúen el proceso de inactivación o destrucción de cisticercos de *T. solium* mediante las temperaturas generadas durante el compostaje.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden compararse con lo descrito por Nava *et al.*, quienes emplearon la cocción para la inactivación de los cisticercos, en los cuales se evaluó la resistencia de los metacestodos de *T. solium*, y se encontró que al someter a un proceso de freído al menos durante una hora, pueden inactivarse los cisticercos en rebanadas de carne no mayores a 5 cm de espesor.¹⁰ Asimismo, la cocción prolongada en agua a punto de ebullición durante dos horas, de fragmentos de carne de cerdo (no mayores a 5 cm) contaminada con cisticercos, inactiva los metacestodos; además encontraron que la inactivación se genera a temperaturas de cocción de 80°C durante 15 minutos, en carne con un espesor de aproximadamente 4 cm.

En la presente investigación se pudo observar que el periodo de mayor inactivación de los cisticercos ocurre entre las 36 y las 48 horas, cuando sólo se presentaron 4% de evaginaciones en la zona superficial, y ninguna en las zonas intermedia y profunda, lo que se relaciona con la temperatura alcanzada dentro de la pila de composta durante ese mismo periodo (Z1 = 47.7°C, Z2 = 48.9°C y Z3 = 48.4°C).

Los resultados obtenidos en el presente estudio con respecto a las temperaturas, muestran valores más elevados durante las primeras 72 horas de iniciado el proceso de compostaje, y son similares a los obtenidos en 2007 por Wilkinson² al utilizar canales de aves muertas por influenza, en las que se registraron temperaturas superiores a los 60°C dentro de los primeros cinco días; en ese trabajo se demostró la inactivación de patógenos (virus de influenza) y se observó que entre más pequeña es la partícula más rápidamente se descompone y se aumenta la temperatura dentro de la pila de la composta.

La temperatura de las pilas de composta de este trabajo presentó una disminución del día 14 al 21. Resultados similares describen Wilkinson² en 2007, Christesten *et al.*,³ en 2002 y Sánchez A,⁶ en 2011, quienes observaron que la temperatura comienza a descender a partir de los 14 a 20 días posteriores al inicio del proceso, por lo que sugieren que se mezcle nuevamente todo el contenido de la composta, para evitar la presencia de zonas sub-letales (que son las áreas en las que no se presenta una inactivación de patógenos adecuada). La humedad relativa (HR) registrada durante el experimento siempre se mantuvo por arriba del 60%, que de acuerdo con Liang *et al.*,⁵

Salud Instituto Nacional de Salud Pública y Fondo de Cultura Económica, 2006; 104-127

2. WILKINSON KG. The biosecurity of on-farm mortality composting. *J Appl Microbiol* 2007; 102: 609-618.
3. CHRISTESTEN K, CARLSBAEK M, KRON E. Strategies for evaluating the sanitary quality of composting. *J Appl Microbiol* 2002; (92): 1143-1158.
4. RODRÍGUEZ M, CÓRDOBA, VÁSQUEZ A. Manual de Compostaje Municipal. Tratamiento de residuos sólidos urbanos. México DF: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2006:63-66.
5. LIANG C, DAS K, MCCLEDON R. The Influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolid composting blend. *Bioresour Technol* 2003; (86): 131-137.
6. SÁNCHEZ A. Conceptos básicos de gestión ambiental y desarrollo sustentable. México DF: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2011.
7. RICKEBOER J, MARGAERT J, COSECANTS J, DEPRINS K, SWINGS J. Microbial aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J Appl Microbiol* 2003; (94): 127-137.
8. VARGAS A., MENDOZA S, MARTÍNEZ R, CIPRIAN A. Elaboración de composta con residuos de granja y cálculos de la mano de obra. Memorias del XLV Congreso Nacional de AMVEC; 2010 agosto 4-7; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2010:108.
9. WAYNE WD. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. México DF: Limusa, 2006.
10. NAVA G, VILLALOBOS AN, ALUJA AS. Efecto de diferentes temperaturas (calor y frío) en carne de cerdo sobre la viabilidad del metacestodo de *Taenia solium*. *Vet Méx* 2009; 40: 191-196.
11. JONES P, MARTIN M. A review of the literature on the occurrence and survival of pathogens of animals

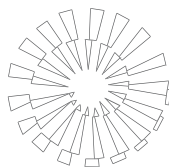
se considera como óptima para el desarrollo del proceso de compostaje de residuos sólidos. Jones y Martin¹¹ informan que la mayoría de los patógenos se eliminan de manera eficiente durante el compostaje de residuos verdes, siempre y cuando la temperatura de 55 °C se mantenga al menos 3 días.

El compostaje no es el mejor mecanismo de eliminación de canales contaminadas, particularmente en sitios donde se cuenta con infraestructura para utilizar otros procedimientos; sin embargo, podría ser una alternativa efectiva sobre todo en lugares donde no se cuenta con incineradores, o no es posible aplicar otros procedimientos como la cocción, sobre todo por la alta carga parasitaria que en ocasiones se observa en las canales, particularmente en zonas rurales, y porque los costos muy probablemente no permitirían su implementación, y en consecuencia, la disposición de canales seguiría siendo un problema en la continuidad del ciclo biológico.

Agradecimientos

Se agradece a la Dra. María Elena Trujillo, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, a la EMVZ Myriam Sánchez, por el apoyo en la realización de la prueba biológica. Este trabajo fue posible gracias al financiamiento brindado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), proyecto DGAPA-IT-214311 y proyecto PAPIIT IN226611.

and humans in garden compost. Standards report November 2003. Oxon, UK: The waste and resources action programme, 2003:1-33.



Factores estresantes en lechones destetados comercialmente

Stress factors in weaned piglet

Daniel Mota Rojas* Patricia Roldán Santiago** Efraín Pérez Pedraza***
Roberto Martínez Rodríguez† Elein Hernández-Trujillo† María Elena Trujillo Ortega†

Abstract

Nowadays, modern swine production techniques promote early weaning. Weaning constitutes one of the most critical stages in the productive life of swine as it is a phase that entails a whole series of stressful factors and physiological changes. This review examines the most important factors that cause stress during this stage, including: separation from the sow, transport, changes in alimentation, lodging in different installations, and being grouped together with strange piglets. The interaction of young pigs with all these stressor factors exercises a cumulative effect that intensifies the level of stress they experience during separation from the sow during the weaning process itself, an event that frequently results in "delayed growth" accompanied by an increased susceptibility to disease-causing, enteric pathogenic agents. For these reasons, it is important to adequately control the variety of factors that affect the physiology, metabolism and behavior of piglets. The conclusion is that both knowledge of the biology of the species and suitable personnel training are necessary to reduce the problems that arise from these issues related to the welfare of weaned piglets. Finally, this study recommends some practices derived from the findings presented, with a view to improving the welfare of recently weaned piglets.

Key words: PIGLET, ANIMAL WELFARE, SEPARATION OF MOTHERS FROM YOUNG.

Resumen

Hoy en día, las modernas técnicas de producción porcina exigen cada vez más destetes tempranos. Sin embargo, el destete representa una de las etapas más críticas en la vida productiva del cerdo, debido a que durante ella se suman una serie de factores estresantes y cambios fisiológicos. En la presente revisión se analizan los factores más importantes que causan estrés durante esta etapa, como la separación de la cerda, el transporte, el cambio de alimento, el alojamiento en nuevas instalaciones y el agrupamiento con lechones extraños. La interacción de los lechones con estos factores estresantes incrementa el nivel de estrés que representa, *per se*, la separación de la cerda y el lechón durante el destete, ya que habitualmente originan "retraso en el crecimiento", además de aumento de la susceptibilidad frente a agentes patógenos entéricos causantes de enfermedades. Por ello, los distintos factores que afectan la fisiología, el metabolismo y el comportamiento del lechón deben ser controlados adecuadamente. Se concluye que el conocimiento de la biología de la especie y un entrenamiento adecuado del personal, son necesarios para disminuir los problemas de bienestar del lechón destetado, por lo que, con el fin de evitarlos, se recomiendan algunas prácticas derivadas de los hallazgos presentados.

Palabras clave: LECHÓN, BIENESTAR ANIMAL, SEPARACIÓN MADRE-CRÍA.

Recibido el 18 de junio de 2013 y aceptado el 14 de enero de 2014.

*Departamento de Producción Agrícola y Animal, Fisiopatología del estrés y bienestar de los animales domésticos. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960, México, D. F.

**Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

***Maestría en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960, México, D. F.

†Departamento de Producción Animal: Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Correspondencia: María Elena Trujillo Ortega, correo electrónico: elenam@unam.mx Tel/Fax: 5622-5883.

Introduction

Animal welfare science has developed rapidly over the last decade and it has been important to separate biological or life sciences from moral judgments.¹⁻⁹ Therefore, to talk about welfare in pig production leads to analyze all productive stages in which the pigs are subjected.^{1,2,7} In this regard, several authors agree that weaning represents one of the most critical stages in the productive life of the pig.¹⁰⁻¹³ Currently, in pig production, weaning is an isolated event that takes place on a specific day and it is usually done by abruptly separating the sow from their piglets around the third and fourth week of age.^{14,15} Weaning is classified as a stressful event, in which the piglet faces great variety of factors causing physiometabolic imbalances that alter and compromise their performance within the following days pigs are taken away from their mothers, due to food change, transport, new units environment and grouping piglets along with unfamiliar animals.^{11,16-18} Several studies mention that the adjustment of the piglets to these stressful stimuli will impact their welfare and productive parameters during their development, causing decreased food intake, growth retardation and, consequently, loss of daily weight increase.^{12,19-21} Likewise, weaning has an impact on piglet behavior, since mixing piglets with different litters in new pens induces aggression, which may affect endocrinology, physiology and metabolism of the weaned piglet.²² In this regard, some authors mention that weaning has a stronger effect on very young piglets.^{23,24} Therefore, abrupt weaning at an early stage causes stress, which is reflected in an increase of athletic activity, change in behaviour and, frequency and intensity of vocalizations.^{25,26} Additionally, the level of stress that represents weaning may increase when the piglet is transported from one place to the other to continue its growth, because transport entails grouping with unfamiliar animals, overcrowding, heat, cold, temperature fluctuations, vibrations and noise that increasingly worsen according to the length of the trip.¹³ Therefore, if weaning, followed by transport of piglets to site 2 of the farm, is done at an early age, the immune status and welfare of the piglet are strongly affected.²⁷⁻²⁹ Consequently, it is important to control all stress factors affecting the piglet during weaning, in order to improve welfare and productivity.^{17,30} In the present review, the main stress factors affecting physiology, metabolism and behaviour of the weaned piglet under commercial conditions is analyzed and discussed.

Introducción

La ciencia del bienestar animal se ha desarrollado rápidamente en los últimos 10 años y ha sido importante para separar lo científico o netamente biológico, de los juicios morales.¹⁻⁹ Así, hablar de bienestar en la producción porcina conduce a analizar todas las etapas productivas bajo las cuales los cerdos son sometidos.^{1,2,7} En relación con ello, diversos autores concuerdan en que el destete representa una de las etapas más críticas en la vida productiva del cerdo.¹⁰⁻¹³ Actualmente en la producción porcina, el destete es un hecho aislado que tiene lugar en un día específico y usualmente se lleva a cabo separando abruptamente a la madre de sus lechones alrededor de la tercera o cuarta semana de edad.^{14,15} Debido a ello, el destete se cataloga como un evento estresante, en el cual el lechón se enfrenta a una gran variedad de factores causantes de desajustes fisiometabólicos que alteran y comprometen su desempeño en los siguientes días a la separación de su madre, debido al cambio de alimento, el transporte, el ambiente de las nuevas instalaciones y el agrupamiento con lechones extraños.^{11,16-18} Diversos estudios mencionan que la capacidad de adaptación del lechón a estos estímulos estresantes repercutirá no sólo en su bienestar, sino en sus parámetros productivos durante su desarrollo, provocando disminución en el consumo de alimento, retraso en su crecimiento y, por consecuencia, pérdida en la ganancia diaria de peso.^{12,19-21} Asimismo, el destete repercute sobre el comportamiento del lechón, ya que el mezclar lechones de diferentes camadas en las nuevas áreas de alojamiento induce la aparición de agresiones, que pueden afectar la endocrinología, fisiología y metabolismo del lechón recién destetado.²² En este sentido, algunos autores señalan que las consecuencias del destete son más marcadas cuando los lechones son más jóvenes.^{23,24} Así, el destete abrupto a una edad temprana es causante de estrés, lo cual se refleja en un incremento en la frecuencia de interacciones agonísticas, alteraciones en su comportamiento y frecuencia e intensidad de las vocalizaciones.^{25,26} Adicionalmente, el nivel de estrés que representa el destete puede incrementarse cuando el lechón es trasladado de un sitio a otro para continuar con su crecimiento, debido a que el transporte implica el reagrupamiento con animales desconocidos, hacinamiento, calor, frío, fluctuaciones de temperatura, vibraciones y ruido, que se agudizan por la duración del viaje.¹³ Por lo tanto, si el destete de los lechones, seguido del traslado al sitio 2 de la granja se realiza a una edad temprana, el bienestar y estado inmune del lechón se ven notoriamente afectados.²⁷⁻²⁹ En consecuencia, resulta fundamental controlar todos

Stress factors in the piglet

Weaning causes an acute stress response, due to social, environmental and nutritional changes in which piglets are subjected.²⁷ Because of this stress, piglets respond to great variety of intertwined-adaptation mechanisms: anatomical, physiological, biochemical, immunological and behavioural.²⁹ In the face of a threat and with the aim to maintain its balance, the organism releases a physiological response to stress as a result of the natural adjustments it makes as it readies itself to handle a stressful situation. Moberg and Mench³¹ define weaning as a stimulus responsible for stress (pain, hunger, thirst, severe climatic conditions, etc.) that breaks the homeostasis of the organism, often with harmful metabolic effects, causing behavioural and physiological changes. Likewise, as a consequence of stress, physiological responses occur (increased heart rate and breathing), in which the autonomic, endocrine and immune systems are involved.³² Although it is known that glucocorticoids mediate many negative stress effects on the metabolism and on the circulatory, digestive and immune systems, there are other substances, such as opioid peptides that should be considered in stress response, because they are released after stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.³³ In relation to this, Kanitz *et al.*³⁴ showed that repeated isolation of piglets at an early age generates stress, which is manifested in behavioural (decrease in activity), neuroendocrine (increase in ACTH and cortisol basal levels) and immune (immunosuppression) responses. Therefore, weaning should be a normal and gradual process, in the course of which animals begin to eat solid food simultaneously to the decline in the production of milk by the sow, in such a way that the piglet gradually suppresses its milk diet, although it faces a constant stress situation.³⁵⁻³⁷

Under natural conditions, during the first week postpartum, the sow moves away with her litter to nurse them approximately 30 times per day, around 10 days of age, the piglets along with the sow become in contact with other sows and their litters in a social group, for which the frequency of nursing decreases. As the production of milk declines, the piglet adjusts to other type of food (foliage and roots) in order to meet their nutritional requirements and, finally, between 4 and 6 months of age, the lactation period comes to an end.³⁸ On the other hand, under commercial conditions, weaning is an isolated event that takes place on a specific day, it is usually done abruptly around the third or fourth week of age, procedure known as early weaning.^{23,37}

The most important factors that cause stress during this stage are: separation from the sow, transport, food

aquellos factores estresantes que inciden en el lechón durante el destete, para mejorar tanto el bienestar como la productividad del lechón.^{17,30} En este contexto, en la presente revisión se analizan y discuten los principales factores estresantes que afectan la fisiología, el metabolismo y comportamiento del lechón destetado bajo condiciones comerciales.

Factores estresantes en el lechón

El destete ocasiona una respuesta de estrés agudo debido a los cambios sociales, ambientales y nutricionales a los que son sujetos los lechones.²⁷ A consecuencia de este estrés, los lechones responden mediante una gran variedad de mecanismos adaptativos entrelazados: anatómicos, fisiológicos, bioquímicos, inmunológicos y conductuales.²⁹ Ante una situación de amenaza y con el objetivo de mantener su equilibrio, el organismo emite una respuesta fisiológica con el fin de intentar adaptarse. Moberg y Mench³¹ definen al destete como un estímulo causante de estrés (dolor, hambre, sed, condiciones climáticas severas, etc.) el cual rompe la homeostasis del organismo, a menudo con efecto perjudiciales en el metabolismo, provocando alteraciones en el comportamiento y cambios fisiológicos. Asimismo, como consecuencia del estrés, ocurren respuestas fisiológicas (aumento en el ritmo cardíaco y respiratorio), en las que se involucran el sistema autonómico, el sistema endocrino y el sistema inmune.³² Aunque se sabe que los glucocorticoides median muchos de los efectos negativos del estrés sobre el metabolismo y sobre los sistemas cardiovascular, digestivo e inmunológico, existen otras sustancias, como los péptidos opioides, que deben considerarse en la respuesta al estrés, pues son liberados luego de la estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.³³ En relación con ello, Kanitz *et al.*³⁴ mostraron que el aislamiento repetido de lechones a una edad temprana genera estrés, el cual se manifiesta en respuestas de comportamiento (disminución de la actividad), neuroendocrinas (aumento de los niveles basales de ACTH y cortisol) e inmunológicas (inmunosupresión). Por lo tanto, el destete debe ser un proceso normal y paulatino, en el transcurso del cual los animales comienzan a ingerir alimentos sólidos de forma simultánea a la reducción de la producción láctea de la madre, de tal modo que el lechón suprime su dieta láctea gradualmente, aunque se enfrenta a una constante situación de estrés.³⁵⁻³⁷

En condiciones naturales, durante la primera semana posparto la cerda se aleja con su camada para alimentarlos aproximadamente 30 veces al día; posteriormente, alrededor de los 10 días de nacidos, los lechones junto con la cerda entran en contacto con

change, relocation in new pens and grouping with unfamiliar animals.³⁹ As result of these factors, a decline in production performance is observed, besides several physiological and pathological responses.^{28,36,40,41}

Social stress during weaning

Early separation from the mother has always been considered a cause of stress in the majority of the animals, which is often manifested with prolonged vocalizations and by effects of long-term behavior.^{35,38} It has been explained that vocalizations are consequence of frustration caused by diet change, because the calls will end when piglets start eating new feed, on average 21 hours after weaning; however, low grunts and calls are also attributed to piglets looking for their mother.²⁹ In this regard, Colson *et al.*²⁹ determined the effect of weaning in 21 and 28 days old piglets on weight gain, behaviour and neuroendocrine responses to stress. These authors observed an increase in growth, change in behaviour (vocalization, aggression and root reflex) and hormonal responses (decreased urine concentration of catecholamines, mainly noradrenaline and cortisone) in piglets weaned at 21 days old, in comparison with piglets weaned at 28 days old. They concluded that endocrine and behavioural changes could be associated with decreased food intake, according to the observed in early weaned piglets, in which growth was lower. Therefore, it is emphasized that weaning at 21 days of life has greater negative consequences on growth and endocrine response to stress, in comparison with weaning at 28 days, although in both cases change in behaviour was observed.

Besides the presence of vocalizations, it is important to observe other types of behaviour after weaning, in order to evaluate the degree of stress to which the animals are subjected. In this regard, Main *et al.*²⁷ found that the age at weaning has an effect on belly nosing, which appears most frequently in early weaned piglets causing an increase in lesions.

The presence of fights have the objective to reestablish hierarchies, and although it is an evident behaviour during weaning, this is not exclusive to this period, since aggression may occur each time a social group changes.³⁸ On a regular basis, the capacity of animals to form a social organization represents the regulatory mechanism of social facilitation and a defensive attitude towards territory utilization, which results in saving metabolic energy.³¹

Rodarte *et al.*⁴² mention that some negative weaning effects are: increased aggression and redirected behaviour; nevertheless, implementing an animal enrichment programme, as hanging objects inside the pig pens, allows to reduce the frequency of these prob-

other sows and their litters in a social group, for which the frequency with which the sow feeds her piglets decreases. As the production of milk from the mother goes declining, the piglet goes adapting to another type of food (roots and foliage) to fill its nutritional requirements, and finally between 4 to 5 months of age lactation has ended.³⁸ On the contrary, in commercial conditions, the weaning is an isolated event that takes place on a specific day, usually it is carried out separating abruptly from the mother of her piglets around the third or fourth week of age, practice known as "early weaning".^{23,37}

Within the most important factors that cause stress during this stage are included: the separation of the sow, the transport, the change in food, the housing in new facilities and the grouping with unfamiliar piglets.³⁹ As a result of these factors a decline in productive performance, as well as various physiological and pathological responses.^{28,36,40,41}

Estrés social durante el destete

The premature separation of the mother is always considered as a cause of stress in the majority of animal species, which is often manifested with prolonged vocalizations and by effects on behaviour in the long term.^{35,38} It has been explained that vocalizations are consequence of the frustration provoked by the change in diet, due to that the piglets stop calling when the piglets start eating the new food, on average 21 hours after weaning; however, low grunts and calls are also attributed to piglets looking for their mother.²⁹ In this regard, Colson *et al.*²⁹ determined the effect of weaning in 21 and 28 days old piglets on weight gain, behaviour and neuroendocrine responses to stress. These authors observed an increase in growth, change in behaviour (vocalization, aggression and root reflex) and hormonal responses (decreased urine concentration of catecholamines, mainly noradrenaline and cortisone) in piglets weaned at 21 days old, in comparison with piglets weaned at 28 days old. They concluded that endocrine and behavioural changes could be associated with decreased food intake, according to the observed in early weaned piglets, in which growth was lower. Therefore, it is emphasized that weaning at 21 days of life has greater negative consequences on growth and endocrine response to stress, in comparison with weaning at 28 days, although in both cases change in behaviour was observed.

lems. Other studies report that the hierarchy level of piglets increases cortisol and plasma concentrations, and shows that submissive piglets record higher levels of cortisol, in comparison with piglets with intermediate status.⁴³ Likewise, overcrowding, or a piglet left alone, exposed to unfamiliar surroundings (new pens), are factors that may have greater social impact on animals and cause stress.⁴⁴ In addition, in a study carried on by Sorrells *et al.*,²² the physiological response and behaviour of piglets housed singly or in group were compared, and the authors found out that the most affected piglets were the single-housed animals, because they present increased heartbeats, breathing rate, activity and vocalizations; however, they concluded that each individual response to a stressful stimulus will depend on the piglet's own capacity and the type and intensity of stressors they face.

Physical or handling stress during weaning

Weaning of piglets is often done between the third and fourth week of age, although in some conventional production systems they are weaned at 17 days old and sometimes even at 12 days of age.⁴⁵ In this regard, weaning age is a factor most highly associated with the level of stress the animals experience during this stage.^{11,38} The main purpose of shortening lactation length is to make best use of the sow, since by shortening lactation days, sows have greater farrowing number per year; therefore, greater number of piglets, besides having less physiological wear.⁴⁶ Likewise, shortening lactation length has the objective to reduce the prevalence of vertical transmission of infectious diseases between the sow and the piglet.⁴⁵ However, it is known that passive immunity from the mother to the piglet is not sufficiently high to prevent infections in all piglets from the same litter, for which some diseases are exacerbated by early weaning.⁴⁷ On the other hand, piglets weaned at earlier ages allows to improve the overall health of the piglet and maximize the reproductive performance, resulting in more piglets weaned per sow/year. Nevertheless, for a long time there have been arguments over the advantages and disadvantages of early weaning. Davis *et al.*⁴⁵ recorded weight gain (235 g) in piglets for each additional day of lactation, besides less percentage of mortality (2%) in piglets weaned at 21 days, which may probably be explained by the immunity gap observed in piglets weaned between 2 and 3 weeks of age. Additionally, early weaning may be associated with behaviour and welfare problems;⁴² for instance, studies done by Weary *et al.*³⁵ report that separating piglets from their mother increases (> 500 Hz) the frequency of vocalizations, mostly in piglets separated from their mother

trés, en comparación con el destete a 28 días, aunque en ambos casos se observaron cambios en el comportamiento.

Además de la presencia de vocalizaciones, otros comportamientos son igualmente importantes al destete para evaluar el grado de estrés al que están siendo sometidos los animales. En relación con ello, Main *et al.*²⁷ encontraron que la edad al destete tiene un efecto sobre la aparición del comportamiento conocido como trompeteo del vientre, que se presenta más frecuentemente en lechones destetados a edades tempranas, el cual tiene como consecuencia un aumento en la aparición de lesiones.

La presencia de peleas entre lechones tiene como finalidad el restablecimiento de jerarquías, y aunque es un comportamiento muy evidente durante el destete, este signo no es sólo exclusivo de este periodo, ya que la agresión puede ocurrir cada vez que un grupo social cambia.³⁸ Regularmente la capacidad de los animales para formar una organización social representa el mecanismo regulador de facilitación social y una actitud defensiva en la utilización del territorio, con el resultado de un ahorro metabólico importante.³¹

Rodarte *et al.*⁴² señalan que algunos de los efectos negativos al destete son: el aumento de la agresión y las conductas redirigidas; no obstante, implantar un programa de enriquecimiento animal, como colgar objetos dentro de las corraletas, reduce la frecuencia de estos problemas. Otros estudios señalan que el nivel jerárquico de los lechones aumenta las concentraciones de cortisol en plasma, y muestran que los lechones sumisos registran niveles más elevados de cortisol, en comparación con los lechones con una jerarquía intermedia.⁴³ Asimismo, la sobrepoblación, o que el lechón se encuentre solo, expuesto a ambientes no familiares (nuevas instalaciones), son factores que pueden tener mayor impacto social sobre los animales y provocar estrés.⁴⁴ Aunado a ello, en un estudio realizado por Sorrells *et al.*²² se compararon la respuesta fisiológica y el comportamiento de lechones alojados individualmente o en grupo, y los autores encontraron que los lechones más afectados son los alojados individualmente, debido a que presentan incremento de los latidos cardiacos, frecuencia de la respiración, mayores movimientos y vocalizaciones; sin embargo, concluyen que la respuesta de cada individuo ante un estímulo causante de estrés dependerá de la capacidad propia del lechón y del tipo e intensidad del estresor al cual se enfrenten.

during the first week of age, in comparison with those separated at fourth week of age. In this regard, Hötzel *et al.*⁴⁸ report that piglets weaned at 20 days of age adjust themselves with greater difficulty to weaning, since they increase the frequency of vocalizations (80 observations), in comparison with older piglets during the first day after weaning (50 observations); likewise, the time they spend walking increases in younger piglets (160 observations), in comparison with piglets weaned at 30 days of age (80 observations). Similarly, Van der Meulen *et al.*²¹ report that increasing weaning age from 4 to 7 weeks decreases cortisol levels and increases food intake (98 g/day *vs* 383 g/d) during the first day after weaning.

Besides the importance of age and consequences, immunodeficiency caused by weaning is aggravated when piglets are transported from one site to the other where they will continue their growth. This is done with the objective to reduce vertical disease transmission and increase potential growth of piglets.¹³ Regardless of whether transport is experimentally or commercially done,¹⁰ the conditions experienced by the piglets during transport, as well as the proximity with unfamiliar animals, overcrowding, heat, cold, temperature fluctuations, vibrations and noise, are factors that contribute to an increase in stress levels that this alone represents weaning.^{13,18,24} For instance, novelty noises to which animals are exposed activate their defense mechanisms and increase their activity for trying to escape. At the same time, mixing them with other animals, a struggle between hierarchies begin, which will be manifested by aggression or fights between them.⁴⁹

Likewise, the trip length is another decisive circumstance in the process, because in long periods of transport food and water deprivation increases^{10,11} and fatigue becomes unbearable.^{2,3,7,50} Hicks *et al.*⁴³ observed significant weight loss in piglets weaned at 28 days of age after a transport period of 4 hours, in comparison with the control group.

On the other hand, during pig transport, loading density may affect health and animal welfare, especially in weaned piglets. In this regard, high loading densities have been associated with high mortality rate in adult pigs.⁵¹ Whereas recent studies in weaned piglets transported for 60 minutes during summer, have reported lower immunological alterations and physical damage when piglets are transported in spaces of 0.06 m²/pig and 0.07 m²/pig, in comparison with spaces of 0.05 m²/pig. For this reason, a minimum space of 0.06 m²/pig is recommended.^{52,53} However, it is important to point out that stress effect of transport on the piglet worsens with early weaning, because of alterations of immune status.^{21,28}

Estrés físico o de manejo durante el destete

A menudo el destete de los lechones se realiza entre la tercera y cuarta semanas de edad, aunque en algunos sistemas de producción convencionales se destetan tan pronto como los lechones alcanzan los 17 días de edad y en algunos casos desde los 12 días.⁴⁵ En este sentido, la edad a la que los lechones son destetados es un factor altamente relacionado con el nivel de estrés que experimentan los animales durante esa etapa.^{11,38} La finalidad principal de acortar los días de lactancia es aprovechar mayormente a la cerda, ya que al disminuir los días de lactancia, las cerdas tienen un mayor número de partos por año y, por lo tanto, mayor número de lechones, además de que tienen menor desgaste fisiológico.⁴⁶ Asimismo, el acortamiento de la lactancia tiene como objetivo reducir la prevalencia de enfermedades de transmisión vertical entre la cerda y el lechón.⁴⁵ Sin embargo, se sabe que la inmunidad pasiva proporcionada por la madre no es lo suficientemente alta como para prevenir que todos los lechones de una misma camada sean infectados por algún patógeno, por lo que algunas enfermedades son exacerbadas por destetes precoces.⁴⁷ Por otro lado, destetar lechones a edades más tempranas permite mejorar el estado sanitario del lechón y maximizar el rendimiento reproductivo, lo que resulta en más cerdos destetados por cerda/año. No obstante, durante mucho tiempo se ha debatido acerca de las ventajas y desventajas de destetar lechones a edades más tempranas. Davis *et al.*⁴⁵ registraron un incremento de peso (235 g) en los lechones por cada día que se incrementa la lactancia, además de menor porcentaje de mortalidad (2%) en lechones destetados a 21 días, lo cual probablemente pueda explicarse debido a que la brecha de inmunidad en los cerdos destetados se da entre las 2 y 3 semanas de edad. Además, el destete temprano puede relacionarse con problemas de conducta y bienestar;⁴² por ejemplo, estudios realizados por Weary *et al.*³⁵ señalan que separar a los lechones de la cerda propicia un incremento (>500 Hz) en la frecuencia de vocalizaciones, siendo mayormente marcado en lechones separados de su madre durante la primera semana de edad, en comparación con aquéllos que son separados a la cuarta semana de edad. En este mismo sentido, Hötzel *et al.*⁴⁸ señalan que los lechones destetados a los 20 días de edad se adaptan con mayor dificultad al destete, ya que presentan incremento en la frecuencia de las vocalizaciones (80 observaciones) en comparación con lechones de mayor edad durante el primer día posdestete (50 observaciones), asimismo, el tiempo que pasan caminando se incrementa en lechones de menor edad (160 observaciones) en comparación con lechones destetados a los 30 días de edad

Environmental stress during weaning

The weaning process in pigs may involve more than separation from the mother and adjust to new odours and noise.³⁸ In this regard, the design of different pig pen systems also has effects on the physical status of the animals, known as environmental stress, which alters animals' life because they stop eating, affecting the development of weaned piglets.²² In this interaction with the environment (season [photoperiod] the following factors have an impact: macro and micro-pen humidity (isolation, floor, walls, types of surfaces, ceilings, etc.), light (lighting). Besides these factors, it is necessary to consider the physical requirements: population density, pig pen design (individual, group) and feeders. In this regard, the quantity of feeders is not sufficient, it will difficult access to food and, consequently, some piglets will not eat enough; likewise, the type of drinking troughs and location may difficult access to water.²⁸ Therefore, an adequate environment is important for animals to have a maximum production performance associated with welfare.

On the other hand, it has been observed that environmental temperature fluctuations found in intensive pig farming decreases performance of the piglet, as consequence of probable appearance of physiological and metabolic abnormalities that lead to decreased food intake.⁵⁴ Arnaiz *et al.*⁵⁵ compared the performance of pigs housed between 29°C *vs* 25°C and found that piglets housed under higher temperatures use more energy to maintain their normal temperature and not tissue disposition, in comparison with piglets housed at 25°C, which show increased food intake and weight gain, because piglets housed under low temperatures excrete feces with lower percentage of dry matter (40.9% *vs* 47.2%), in such a way that greater quantity of humidity in feces from these animals may be associated with a reduction in time in which food remains in the intestine, for which digestive and absorption efficiency may be reduced due to either time exposure to digestive enzymes or to area of exposure. Nevertheless, floor surface and pen density are two factors affecting temperature in piglets.⁵⁶ In this regard, Hyun *et al.*¹⁹ report that increased temperature, reduced space allowance and regrouping affect growth, food intake and feed conversion efficiency in piglets. Additionally, Oh *et al.*⁵⁷ recently found that maintaining weaned piglets in a space of 0.21 m², in comparison with piglets in 0.40 m², causes a slight reduction in food intake in piglets weaned in reduced spaces, which suggests that piglets show a linear reduction in daily weight gain because of space availability. Likewise, with the objective to improve the performance of weaned piglets, modification of environmental conditions has been

(80 observaciones). Asimismo, Van der Meulen *et al.*²¹ mencionan que incrementar la edad de destete de 4 a 7 semanas reduce los niveles de cortisol y aumenta el consumo de alimento (98 g/d *vs* 383 g/d) durante el primer día posdestete.

Adicionalmente a la importancia que tiene la edad y sus consecuencias, el déficit inmunológico provocado por el destete se agrava cuando los lechones deben ser trasladados de un sitio a otro en donde continuarán su proceso de crecimiento. Esta actividad se realiza con el objetivo de reducir la transferencia vertical de enfermedades, e incrementar el potencial de crecimiento de los lechones.¹³ Independientemente de si el traslado se realiza de manera experimental o comercial,¹⁰ las condiciones que experimenta el lechón durante el transporte, como la proximidad con animales desconocidos, el hacinamiento, el calor, el frío, las fluctuaciones de temperatura, vibraciones y ruido, son factores que contribuyen a incrementar el nivel de estrés que ya de por sí representa el destete.^{13,18,24} Por ejemplo, los sonidos novedosos a los que están expuestos los animales activan sus mecanismos de defensa e incrementan su actividad para intentar escapar. Al mismo tiempo, al mezclarlos con otros animales se provoca una lucha por la jerarquización, la cual se manifestará mediante agresiones o peleas entre ellos.⁴⁹

Asimismo, la duración del viaje es otra circunstancia determinante en el proceso, ya que con periodos de transporte prolongados la privación de alimento y agua se incrementa,^{10,11} al mismo tiempo que la fatiga se vuelve más intolerable.^{2,3,7,50} Hicks *et al.*⁴³ observaron una pérdida significativa de peso en cerdos destetados a los 28 días de edad después de un transporte de 4 horas, con respecto al grupo testigo.

Por otro lado, durante el transporte de cerdos la densidad de carga puede afectar la salud y bienestar de los animales, especialmente en aquéllos que han sido destetados. En este sentido, se han asociado altas densidades de carga con elevadas tasas de mortalidad en cerdos adultos.⁵¹ Mientras que estudios recientes en cerdos destetados y transportados por 60 minutos durante el verano, han reportado menores alteraciones inmunológicas y daños físicos cuando los lechones son transportados en espacios de 0.06 m²/cerdo y 0.07 m²/cerdo, en comparación con espacios de 0.05 m²/cerdo. Por esta razón se sugiere un espacio mínimo de 0.06 m²/cerdo.^{52,53} Sin embargo, es importante resaltar que el efecto del estrés del transporte sobre el lechón se agrava cuando el destete se realiza de manera precoz, al presentar alteraciones en su estado inmunológico.^{21,28}

proposed, for instance, Bruininx *et al.*⁵⁸ suggest that subjecting weaned piglets to 23 hours of light and one of darkness, food intake and daily weight gain is stimulated during the second week after weaning.

Nutritional and immunological stress during weaning

Immediately after weaning there is a period of villous atrophy and hyperplasia of the intestinal crypts, associated with decreased food intake, caused by psychological effects generated by mother-piglet separation that may lead to cortisone release.^{38,59} These sources of stress cause decreased food intake.¹⁴ In this regard, it has been demonstrated that villous height rapidly decreases in piglets weaned at 21 days of age, around 75% after 24 hours post-weaning, in comparison with the height during lactation, also villous atrophy continues, although at a slower pace, until 5 days after weaning.³⁶ However, there are other factors that may also contribute to intestinal atrophy, such as: absence of milk intake, dry or liquid diet, proliferation of microorganisms, or indigestible components in post-weaning diet,⁶⁰ causing decreased food intake (80%) in piglets during the first 12 hours after weaning, and around 10% of piglets begin to eat after 24 hours post-weaning.^{58,61,62}

Before weaning, the intestinal villi are anatomically very long, well-structured and very efficient in absorption of nutrients, due to two reasons: first, minimal dandruff during lactation, and second, crypt cells are capable of replacing villi cells at the same speed old cells are removed.⁶³ However, by effect of weaning, height is reduced almost by half and crypt depth increases; therefore, the absorption area of the intestine is reduced.³⁸

Thus, decreased energy intake followed by complete solid food change causes growth interruption and disorders in intestine structure and function, which occurs 24 hours after weaning; these changes often reflect a decrease in villi height, reduction in the specific activities of lactase and decreased absorption capacity.^{14,64} It is probable that the combined effect of these factors reduces digestive efficiency and small intestine absorption, contributing to reduced food intake and growth retardation observed after weaning.⁵⁹

Pluske *et al.*¹⁴ report that one of the functions of the intestinal mucosa is to provide a large surface area for nutrient absorption. However, enzymes that degrade nutrients of the elaborated diets and are administered to piglets (amylase, lipase, maltase and proteases) are found at low levels until the fourth week of age. Likewise, the stomach acidity does not reach appreciable levels until the third or fourth week after weaning

Estrés medioambiental durante el destete

El destete en lechones puede implicar más que la separación de la madre y el cambio en la alimentación que ella produce, ya que los lechones, al ser destetados, son alojados en un nuevo ambiente, por lo que tienen que adaptarse a nuevos olores y sonidos.³⁸ En relación con ello, se sabe que el diseño de diferentes sistemas de corrales también tiene efectos en el estado físico de los animales, lo que se conoce como estrés medioambiental, el cual altera la vida de los animales debido a que dejan de consumir alimento, lo que afecta el desarrollo del lechón destetado.²² En esta interacción con el ambiente (estación [fotoperiodo]) influyen: el macro y micro clima, la temperatura (calefacción y refrigeración), la ventilación (velocidad del aire, pobre calidad de aire), la humedad de las instalaciones (aislamiento, piso, paredes, tipo de suelo, muros, techos, etc.), la luminosidad (iluminación). Además de estos factores es necesario considerar los requerimientos físicos: densidad de población, diseño de las instalaciones (individual, grupo) y de comederos. En este sentido, si la cantidad de comederos es insuficiente, dificultará el acceso del lechón al alimento y, por consiguiente algunos lechones no comerán lo suficiente, de igual manera, el tipo de bebedero y su ubicación pueden dificultar que el lechón tome la cantidad de agua que requiere.²⁸ Por ello es indispensable un medio ambiente adecuado para que los animales puedan tener su máximo desempeño productivo, asociado al bienestar.

Por otra parte, se ha visto que las variaciones de la temperatura ambiente encontradas en la producción intensiva de cerdos disminuyen el desempeño del lechón como consecuencia de la posible aparición de trastornos fisiológicos y metabólicos que conducen a la disminución en el consumo de alimento.⁵⁴ Arnaiz *et al.*⁵⁵ realizaron una comparación entre el desempeño de lechones alojados con temperaturas de 29 °C *vs* 25 °C, y encontraron que los lechones alojados a temperaturas más altas utilizan gran parte de la energía consumida para regular su temperatura y no para la deposición de tejido; en contraste, los lechones alojados a 25°C presentan mayor consumo de alimento y ganancia de peso, lo cual puede deberse a que los lechones alojados a temperaturas bajas excretan heces con menor porcentaje de materia seca (40.9% *vs* 47.2%), de tal manera que el mayor contenido de humedad en las heces de estos animales puede asociarse con una disminución en el tiempo que el alimento se encuentra en el intestino, por lo que la efectividad de la digestión de los nutrientes y su absorción pueden verse reducidas debido tanto al menor tiempo de exposición de las enzimas digestivas, como al área de absorción. No

(with pH = 4), which complicates even more digestion of proteins in dry diet.⁶⁵ In this regard, the protein level in the diet plays an important role as causative stress factor in the period immediately after weaning, since the ability of piglets to digest and absorb high protein diets may be compromised because proteolytic enzymes of the spleen are not completely efficient during this period; therefore, non-digestible proteins are subjected to bacterial fermentation in the small and large intestine, which increases the intestinal pH and causes proliferation of pathogens and irritating substances such as ammonia.⁶⁶ For this reason, when the piglet begins to eat solid food based on vegetable material, its susceptibility to gastrointestinal disorders increases, since intestinal functions reduction by effect of weaning allows bacterial proliferation and increased fermentation of low-digestible nutrients in the large intestine, which may lead to frequent outbreaks of diarrhea.⁶⁷ This is the most critical period in the life of the pig, due to presence of anorexia and malnutrition, which have an impact on digestive physiology and in the animal's development, with 50% morbidity in weaned piglets.^{36,68}

Likewise, the new born piglet depends on maternal passive immunity, since it mainly receives immunoglobulins (Ig) through ingestion of colostrum, which are capable of crossing the intestinal wall during the first hours of life, but its importance decreases over time. Thus, during lactation, the piglet receives maternal milk, which bathes the intestine walls and provides certain local immunity through immunoglobulin IgA.⁶⁹ Therefore, the piglet is not able to produce its own immunological activity in adequate quantities until reaching at least 28 or 30 days of age. Consequently, any stress factor, whether digestive, handling or combined, will affect the piglet in critical moments from an immunological point of view,^{70,71} for which proper care must be taken in health and hygiene of piglets mainly between 10 and 21 days of age, since the immunity gap in weaned piglets occurs between 2 and 3 weeks after birth, while own immunity of piglets begins to increase approximately between the third and fourth week of age.⁷² In this regard, Niekamp *et al.*²⁸ report that weaning age has a marked effect on the immune status of the piglet, since piglets weaned at 14 days of age show low NK cell cytotoxicity, in comparison with piglets weaned between 21 and 28 days, because animals weaned at older ages seem to have more developed immune system and are able to generate a stronger immune response when stimulated by an environmental antigen during weaning. However, an inflammatory response and subsequent production of acute-phase proteins and cytokines, decreases protein disposition and growth; therefore, piglets with high immune system activation show decreased weight gain

obstante, cuando los lechones llegan al siguiente sitio de la granja para ser alojados, el material de los pisos y la densidad en las jaulas son dos factores que influyen en la regulación de la temperatura del lechón.⁵⁶ En relación con ello, Hyun *et al.*¹⁹ informan que el incremento en la temperatura, reducción del espacio vital y reagrupamiento, afectan el crecimiento, la ingesta de alimento y la eficiencia en la conversión de alimento en el lechón. Aunado a ello, recientemente Oh *et al.*⁵⁷ encontraron que mantener a lechones destetados en una superficie de 0.21m² en comparación con lechones sobre un espacio de 0.40m², ocasiona una ligera reducción en el consumo de alimento en aquellos lechones destetados alojados en espacios reducidos, lo cual sugiere que los lechones presentan una reducción lineal en la ganancia diaria de peso por efecto de la disponibilidad de espacio. Asimismo, con la finalidad de mejorar el rendimiento de los lechones destetados se ha propuesto modificar las condiciones ambientales, por ejemplo, Bruininx *et al.*⁵⁸ sugieren que al someter lechones destetados a 23 h de luz y una de oscuridad se estimula el consumo de alimento y la ganancia diaria de peso durante la segunda semana posdestete.

Estrés nutricional e inmunológico durante el destete

Inmediatamente después del destete hay un periodo de atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas en el intestino delgado, asociado con una disminución en el consumo de alimento y provocado por los efectos psicológicos que genera la separación de la madre, que puede conducir a una liberación de cortisona.^{38,59} Estas causas de estrés provocan una disminución en el consumo de alimento.¹⁴ En relación con ello, se ha demostrado que la altura de las vellosidades disminuyen rápidamente en cerdos destetados a los 21 días de edad, hasta cerca de un 75% a las 24 horas posdestete, en comparación con la altura que presentaban durante la lactancia, además, se observa que la atrofia de las vellosidades continúa, aunque a menor ritmo, hasta los 5 días posteriores al destete.³⁶ Sin embargo, existen otros factores que pueden contribuir también a la atrofia intestinal, tales como la falta de consumo de leche, la presentación de la dieta (seca o líquida), la invasión por microorganismos, o la introducción de compuestos poco digestibles en la dieta posdestete,⁶⁰ originando que los lechones disminuyan hasta en 80% su consumo de alimento durante las primeras 12 horas posteriores al destete, y alrededor del 10% de los lechones comienzan a ingerir alimento después de 24 horas de ser destetados.^{58,61,62}

Antes del destete, las vellosidades intestinales ana-

and food intake, in comparison with piglets that present low immune system activation, between 6 and 27 kilograms live weight.⁶⁶

Nevertheless, it is also necessary to consider that the epithelium of the small intestine has two important functions, besides the aforementioned nutrient absorption: first, the secretion and absorption of water and electrolytes to maintain proper viscosity of digesta/luminal content, and the second is to work as a barrier against harmful agents and pathogens.⁷¹ Thus, the epithelium of the intestine represents the first barrier between the internal environment of the piglet and the environmental antagonists, mainly because it is externally protected by water layer and mucus, and internally by tight junctions of enterocytes, which together function as barriers either external or internal, regulating the passage of molecules, including nutrients and harmful elements such as pathogens. Likewise, the mucus layer prevents any macromolecule from entering the body and remains permeable for nutrients, providing resistance to intestinal pathogen colonization by adhesion of commensal bacteria in the luminal area.^{36,66} In this regard, several studies have reported that weight loss decreases antibody synthesis, cellular immunity and causes resistance reduction against pathogens, mainly when piglets are exposed to chronic or acute environmental stress. In this context, glucocorticoids released as response to a stress stimulus has anti-inflammatory effect, delays healing, inhibits formation of antibodies, number of lymphocytes and eosinophils decline, causing regression of thymus size and lymphatic organs.³¹ Nevertheless, social interactions and piglet transport also affect the immune status of the piglet.

Conclusion

Weaning in swine commercial production is the period in which the piglet is exposed to greater number of stress factors; therefore, it is very important to propose strategies that help decrease the effect of these stress factors on piglets, since animals not only have to face separation from their mother and littermates, but also, they experience environmental and handling changes to which they are not used to and demand metabolic, physiological, endocrine and behavioural adjustments that may be exacerbated by the age in which they are weaned. In this regard, recent studies have demonstrated that early separation of piglets from their mother (17 days) has a negative effect on the immune status, favouring acute-phase proteins and cytokines response. Therefore, age plays an important role during this stage, because all stress factors affect physiology and behaviour of piglets, compromising their welfare. Con-

tómicamente son muy largas, bien estructuradas y muy eficientes en la absorción de nutrientes debido a dos razones: en primer lugar a que la descamación de células durante la lactancia es mínima y, en segundo lugar, a que las células de las criptas son capaces de reemplazar a las células de las vellosidades a la misma velocidad a la que se descaman.⁶³ Sin embargo, por efecto del destete su longitud se reduce casi a la mitad y aumenta la profundidad de las criptas, por lo tanto el área de absorción del intestino delgado se reduce.³⁸

Así, la asociación en la disminución en el consumo de energía que sigue al cambio completo a la comida sólida causa interrupción del crecimiento y desórdenes en la estructura y función del intestino, lo cual ocurre a partir de las primeras 24 horas tras el destete; generalmente estos cambios suponen un descenso en la altura de las vellosidades intestinales, reducciones en la actividad específica de la enzima lactasa y disminución de la capacidad de absorción.^{14,64} El efecto combinado de estos factores probablemente cause una reducción en la capacidad digestiva y de absorción del intestino delgado, lo que contribuye al menor consumo de alimentos y al escaso ritmo de crecimiento observado después del destete.⁵⁹

Pluske *et al.*¹⁴ señalan que una de las funciones de la mucosa intestinal es proporcionar una amplia superficie para la absorción de nutrientes. Sin embargo, las enzimas encargadas de degradar los nutrientes de las dietas elaboradas y suministradas a los lechones (amilasa, lipasa, maltasa y proteasas) se encuentran en niveles bajos de producción hasta la cuarta semana de edad. Asimismo, la acidez del estómago no llega a niveles apreciables hasta la tercera o cuarta semana posdestete (con valores de pH = 4), lo que complica aún más la digestión de la proteína de la dieta seca.⁶⁵ En este sentido, el nivel de proteína en la dieta juega un papel importante como factor causante de estrés en el periodo inmediato posterior al destete, ya que la capacidad de los lechones para digerir y absorber dietas altas en proteína puede verse comprometida debido a que las enzimas proteolíticas del páncreas aún no son completamente eficientes en este periodo, por lo tanto, las proteínas que no son digeridas están sujetas a la fermentación bacteriana en el intestino delgado y grueso, lo que aumenta el pH intestinal y trae como consecuencia la proliferación de patógenos y la producción de sustancias irritantes como el amoníaco.⁶⁶ Por esta razón, cuando el lechón empieza a consumir dietas sólidas con base en materias primas vegetales, se incrementa su susceptibilidad a los desórdenes gastrointestinales, ya que la reducción de la función del intestino por efecto del destete permite la proliferación de bacterias, además del aumento en la fermentación de los nutrientes menos digestibles en el intestino grueso provenientes de la dieta, lo que puede

cerning behaviour, stress caused by weaning increases aggression, redirected behaviour and vocalizations up to 80%, in comparison with piglets weaned at an older age; therefore, it is recommended to implement an environmental enrichment programme in weaning pens to reduce, as possible, the stress level and encourage the piglet to adjust more rapidly to this new stage, above all in early weaning.

Weaning followed by transport to site 2 of the farm, exposes the piglets to new stress stimuli which have direct impact on their welfare; thus, long transport times increases food and water deprivation and fatigue becomes unbearable. On the other hand, new housing area exposes the piglet to new stressors such as: increased temperature, vital space reduction and regrouping, which regardless of age, cause poor growth, decreased food intake and, therefore, reduced feed conversion. It is thus recommended to maintain piglets under optimal environmental conditions, taking into account macro and micro climate, temperature, ventilation, humidity, facilities and lightning. In conclusion, it is very important to conduct further studies aimed to implement new alternatives so that separation of the piglet from its mother be carried out by methods with low stress levels, evaluate the relevance of staggered weaning, establish the ideal weaning age not in regard to productivity, but based on the piglet's welfare; avoid weaning and pig transport to site 2 on the same day, with the objective to reduce the stress levels these factors produce and, therefore, improve the welfare of weaned pigs.

Acknowledgements

This review was made possible thanks to a grant from the PAPIIME Project PE-207111 entitled "Improving the instruction of swine reproduction in Veterinary Medicine and Animal Science".

References

1. MARTINEZ-RODRIGUEZ R, MOTA-ROJAS D, TRUJILLO-ORTEGA ME, OROZCO-GREGORIO H, HERNANDEZ-GONZALEZ R, ROLDAN-SANTIAGO P *et al.* Physiological response to hypoxia in piglets of different birth weight. *Italian J Anim Sci* 2011;10:250-253.
2. MOTA-ROJAS D, MARTÍNEZ-BURNES J, VILLANUEVA-GARCIA D, ROLDAN-SANTIAGO P, TRUJILLO ORTEGA ME, OROZCO-GREGORIO H *et al.* Animal welfare in the newborn piglet: a review. *Vet Med-Czech* 2012;57:338-49.
3. MOTA-ROJAS D, OROZCO-GREGORIO H, VILLANUEVA-GARCIA D, BONILLA-JAIME H, SUAREZ-BONILLA X, HERNANDEZ-GONZALEZ R

conducir a brotes frecuentes de diarrea.⁶⁷ Este periodo es el más crítico en la vida del cerdo, pues se presentan estados de anorexia y desnutrición que repercuten en la fisiología digestiva y en el desarrollo del animal, con una morbilidad de 50% de los lechones destetados.^{36,68}

Asimismo, se sabe que el lechón recién nacido depende de la inmunidad pasiva suministrada por la madre al nacer, ya que principalmente recibe inmunoglobulinas (Ig's) a través del calostro, las cuales son capaces de atravesar la pared intestinal durante las primeras horas de vida, pero su importancia disminuye con el tiempo. Así, durante la lactancia el lechón recibe leche materna, que baña las paredes intestinales y proporciona cierta inmunidad local a través de las inmunoglobulinas IgA.⁶⁹ Por lo tanto, el lechón no es capaz de producir su propia actividad inmunológica en cantidades adecuadas hasta alcanzar al menos los 28 o 30 días de edad. Por ello, cualquier factor de estrés, ya sea digestivo, de manejo, o combinado, va a afectar al lechón en momentos críticos desde un punto de vista inmunológico,^{70,71} por lo que deben tenerse apropiados cuidados en la salud e higiene de los lechones, principalmente entre los 10 y 21 días de edad, ya que la brecha de inmunidad en lechones destetados se da entre las 2 y 3 semanas posteriores al nacimiento, mientras que la propia inmunidad del lechón comienza a incrementarse aproximadamente entre la tercera y cuarta semanas de edad.⁷² En relación con ello, en estudios realizados por Niekamp *et al.*²⁸ se menciona que la edad al destete tiene un efecto marcado en lo que se refiere al estado inmune del lechón, ya que lechones destetados a los 14 días de nacidos presentan una disminución en la citotoxicidad de sus células NK, en comparación con lechones que se destetan entre los 21 y 28 días, debido a que los animales destetados a edades más avanzadas parecen tener más desarrollado el sistema inmunológico y pueden ser más eficientes al presentar una respuesta inmune al ser estimulado por un antígeno del ambiente durante el destete. Sin embargo, una respuesta inflamatoria y la subsecuente producción de citocinas y proteínas de fase aguda, disminuyen la deposición de proteína y el crecimiento, por lo tanto, los lechones con una activación elevada del sistema inmune muestran disminución en la ganancia de peso y consumo de alimento, en comparación con lechones que presentan una activación del sistema inmune baja, entre los 6 y 27 kg de peso.⁶⁶

No obstante, es indispensable también considerar que el epitelio del intestino delgado tiene dos funciones importantes, además de la absorción de nutrientes anteriormente mencionada: la primera de esas funciones es la secreción y absorción de agua y electrolitos para mantener la viscosidad del contenido luminal, y la segunda, servir como barrera

- et al.* Foetal and neonatal energy metabolism in pigs and humans: a review. *Vet Med-Czech* 2011;56:215-25.
4. MOTA-ROJAS D, OROZCO-GREGORIO H, GONZALEZ-LOZANO M, ROLDAN-SANTIAGO P, MARTINEZ-RODRIGUEZ R, SANCHEZ-HERNANDEZ M *et al.* Therapeutic Approaches in Animals to Reduce the Impact of Stress During Transport to the Slaughterhouse: A Review. *Int J Pharmacol* 2011;7:568-78.
 5. OROZCO-GREGORIO H, MOTA-ROJAS D, BONILLA-JAIME H, TRUJILLO-ORTEGA ME, BECERRIL-HERRERA M, HERNANDEZ-GONZALEZ R *et al.* Effects of administration of caffeine on metabolic variables in neonatal pigs with peripartum asphyxia. *Am J Vet Res* 2010;71:1214-9.
 6. ROLDAN-SANTIAGO P, GONZALEZ-LOZANO M, FLORES-PEINADO SC, CAMACHO-MORFIN D, CONCEPCION-MENDEZ M, MORFIN-LOYDEN L *et al.* Physiological Response and Welfare of Ducks During Slaughter. *Asian J Anim Vet Adv* 2011;6:1256-3.
 7. MOTA-ROJAS D, VILLANUEVA-GARCÍA D, HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ R, ROLDAN-SANTIAGO P, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ R, MORA-MEDINA P *et al.* Assessment of the vitality of the newborn: An overview. *Sci Res Essays* 2012;7:712-8.
 8. MOTA-ROJAS D, TRUJILLO-ORTEGA M, BECERRIL-HERRERA M, ROLDAN-SANTIAGO P, GONZÁLEZ-LOZANO M, GUERRERO-LEGARRETA I. Effect of the Sacrifice Method on Critical Blood Variables and Biochemistry Consequences of the Guinea Pig Meat (*Cavia porcellus*). *Revista Científica, FCV-LUZ* 2012;XXII:51-8.
 9. MOTA-ROJAS D, BECERRIL-HERRERA M, ROLDAN-SANTIAGO P, ALONSO-SPILSBURY M, FLORES-PEINADO S, RAMIREZ-NECOECHEA R *et al.* Effects of long distance transportation and CO2 stunning on critical blood values in pigs. *Meat Sci* 2012;90:893-8.
 10. BERRY RJ, LEWIS NJ. The effect of duration and temperature of simulated transport on the performance of early-weaned piglets. *Can J Anim Sci* 2001;81:199-204.
 11. LEWIS NJ, BERRY RJ. Effects of season on the behaviour of early-weaned piglets during and immediately following transport. *Appl Anim Behav Sci* 2006;100:182-92.
 12. WAMNES S, LEWIS NJ, BERRY RJ. The performance of early-weaned piglets following transport: Effect of season and weaning weight. *Can J Anim Sci* 2006;86:337-43.
 13. WAMNES S, LEWIS NJ, BERRY RJ. The behaviour of early-weaned piglets following transport: Effect of season and weaning weight. *Can J Anim Sci* 2008;88:357-67.
 14. PLUSKE JR, DURMIC Z, PAYNE HG, MANSFIELD J, MULLAN BP, HAMPSON DJ *et al.* Microbial diversity in the large intestine of pigs born and reared in different environments. *Livest Sci* 2007;108:113-6.
 15. PARRATT CA, CHAPMAN KJ, TURNER C, JONES PH, MENDEL MT, MILLER BG. The fighting behaviour of piglets mixed before and after weaning in the

para agentes nocivos y patógenos.⁷¹ De este modo, el epitelio del intestino representa la primera barrera entre el medio interno del lechón y los agentes que provienen del ambiente, principalmente por estar protegido externamente por una capa de agua y moco, e internamente por uniones estrechas de enterocitos, que en conjunto funcionan como barreras tanto externas como internas, regulando el paso de moléculas, entre las que se encuentran nutrientes y elementos nocivos como agentes patógenos. Asimismo, la capa de moco evita la entrada de macromoléculas y permanece permeable para los nutrientes, proporcionando resistencia ante la colonización de patógenos intestinales mediante la adhesión de bacterias comensales en la superficie luminal.^{36,66} En torno a este punto, muchos estudios han señalado que la pérdida de peso disminuye la síntesis de anticuerpos, la inmunidad celular y provoca una disminución de la resistencia contra patógenos, principalmente cuando los lechones están expuestos a estrés ambiental, crónico o agudo. En este contexto, los glucocorticoides liberados como respuesta a un estímulo estresor tienen efectos antiinflamatorios, además retardan la cicatrización, inhiben la formación de anticuerpos, disminuyen el número de linfocitos y de eosinófilos, provocando una regresión del timo y de los órganos linfáticos.³¹ No obstante, las interacciones sociales y el traslado de los lechones también juegan un papel importante en las repercusiones del estado inmune del lechón.

Conclusiones

El destete en la producción comercial de cerdos es la etapa en la que el lechón se expone a un mayor número de factores causantes de estrés, por ello resulta de suma importancia plantear estrategias que ayuden a disminuir el efecto que éstos producen en los lechones, ya que no sólo deben enfrentarse a la separación de su madre y compañeros de camada, sino además, deben experimentar cambios en su ambiente y manipulaciones a las cuales no están habituados y que les exigen ajustes metabólicos, fisiológicos, endocrinos y conductuales, los cuales pueden ser exacerbados por la edad a la que se realiza el destete. En este sentido, estudios recientes han demostrado que la separación de los lechones de su madre a una edad temprana (17 días) afecta negativamente el estado inmune del lechón, ya que favorece la liberación de citocinas y proteínas de fase aguda. Por lo tanto, la edad juega un papel importante durante esta etapa, debido a que todos los factores estresantes afectan la fisiología y el comportamiento de los lechones, lo que compromete su bienestar. En torno al comportamiento, el estrés

presence or absence of a sow. *Appl Anim Behav Sci* 2006;101:54-67.

16. ROLDAN-SANTIAGO P, MOTA-ROJAS D, TRUJILLO-ORTEGA ME, HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ R, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ R, SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ M. El estrés del destete en lechones de 21 días: respuestas fisiometabólicas. *Acontecer Porcino* 2011;106:42-8.
17. PÉREZ-PEDRAZA E, ROLDAN-SANTIAGO P, TRUJILLO-ORTEGA M, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ R, OROZCO-GREGORIO H, BECERRIL-HERRERA M, MOTA-ROJAS D. Factores estresante en lechones. *Memorias de las 5ta Jornada de Estrés Animal y 5to. Curso de Bienestar Animal y Calidad de la Carne*; 2012 Julio 5 y 6; Instalaciones del Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), FMVZ. UNAM Jilotepec, Edo.Méx. 2012;15-21.
18. ROLDAN-SANTIAGO P, MARTINEZ-RODRIGUEZ R, YANEZ-PIZANA A, TRUJILLO-ORTEGA ME, PÉREZ-PEDRAZA E, SANCHEZ-HERNANDEZ M *et al.* Stressor factors in the transport of weaned piglets: a review. *Vet Med-Czech* 2013;58:241-251.
19. HYUN Y, ELLIS M, RISKOWSKI G, JOHNSON RW. Growth performance of pigs subjected to multiple concurrent environmental stressors. *J Anim Sci* 1998;76:721-7.
20. BRUININX E, HEETKAMP MJW, VANDENBOGAART A, VAN DER PEET-SCHWERING CMC, BEYNEN AC, EVERTS H *et al.* A prolonged photoperiod improves feed intake and energy metabolism of weanling pigs. *J Anim Sci* 2002;80:1736-45.
21. VAN DER MEULEN J, KOOPMANS SJ, DEKKER RA, HOOGENDOORN A. Increasing weaning age of piglets from 4 to 7 weeks reduces stress, increases post-weaning feed intake but does not improve intestinal functionality. *Anim* 2010;4:1653-61.
22. SORRELLS AD, EICHER SD, SCOTT KA, HARRIS MJ, PAJOR EA, LAY DC *et al.* Postnatal behavioral and physiological responses of piglets from gilts housed individually or in groups during gestation. *J Anim Sci* 2006;84:757-66.
23. PLUSKE JR, HAMPSON DJ, WILLIAMS IH. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest Prod Sci* 1997;51:215-36.
24. ROLDAN-SANTIAGO P, MOTA-ROJAS D, TRUJILLO-ORTEGA ME, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ R. Estresores comunes en lechones. *Memorias de las XI Jornadas Universitarias de Ginec Obstetricia y Perinatología Animal UAM-X, México D.F.* 2011;107-11.
25. WOROBEK EK, DUNCAN IJH, WIDOWSKI TM. The effects of weaning at 7, 14 and 28 days on piglet behaviour. *Appl Anim Behav Sci* 1999;62:173-82.
26. WIDOWSKI TM, TORREY S, BENCH CJ, GONYOU HW. Development of ingestive behaviour and the relationship to belly nosing in early-weaned piglets. *Appl Anim Behav Sci* 2008;110:109-27.
27. MAIN RG, DRITZ SS, TOKACH MD, GOODBAND RD, NELSEN JL. Increasing weaning age improves

que ocasiona el destete aumenta la agresión, las conductas redirigidas y las vocalizaciones hasta en un 80 %, en comparación con lechones destetados a edades más avanzadas, por ello se recomienda que se implemente un programa de enriquecimiento ambiental en las corraletas de destete, para reducir, en lo posible, el nivel de estrés y propiciar que el lechón se adapte más rápidamente a esta nueva etapa, sobre todo cuando el destete se establece a edades tempranas.

El destete seguido del traslado al sitio 2 de la granja hace que el lechón sea expuesto a nuevos estímulos estresantes que repercuten directamente en su bienestar, así, con periodos de transporte prolongados la privación de alimento y agua se incrementan, al mismo tiempo que la fatiga se vuelve más frecuente. Por otro lado, la nueva área de alojamiento expone al lechón a nuevos estresores como son: el incremento en la temperatura, la reducción del espacio vital y el reagrupamiento, los cuales, independientemente de la edad, ocasionan disminución del crecimiento, de la ingesta de alimento y, por lo tanto, de la eficiencia en la conversión de alimento en el lechón; por ello se recomienda mantener a los lechones bajo condiciones ambientales óptimas, tomando en cuenta el macro y micro clima, temperatura, ventilación, humedad, instalaciones y luminosidad. En conclusión, es de suma importancia seguir realizando estudios que permitan implementar alternativas donde la separación del lechón de su madre sea a través de métodos con bajos niveles de estrés, evaluar la relevancia de los destetes escalonados, establecer la edad ideal al destete, no en relación con la productividad, sino con base en el bienestar del lechón; evitar destetar y transportar al lechón al sitio 2 el mismo día, todo ello con el propósito de reducir el nivel de estrés que estos factores propician y, por ende, mejorar el bienestar del lechón destetado.

Agradecimiento

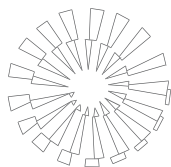
Este artículo fue realizado gracias al apoyo del proyecto PAPIIME PE-207111, que lleva por título: "Mejoramiento de la Enseñanza en la Reproducción Porcina en la Medicina Veterinaria y Zootecnia".

pig performance in a multisite production system. *J Anim Sci* 2004;82:1499-507.

28. NIEKAMP SR, SUTHERLAND MA, DAHL GE, SALAK-JOHNSON JL. Immune responses of piglets to weaning stress: Impacts of photoperiod. *J Anim Sci* 2007;85:93-100.
29. COLSON V, ORGEUR P, FOURY A, MORMEDE P. Consequences of weaning piglets at 21 and 28 days on growth, behaviour and hormonal responses. *Appl Anim Behav Sci* 2006;98:70-88.

30. EDWARDS SA. Perinatal mortality in the pig: environmental or physiological solutions? *Livest Prod Sci* 2002;78:3-12.
31. MOBERG GP, MENCH JA. The Biology of Animal Stress: basic principles and implications for animal welfare. CABI Publishing, 2000.
32. ALONSO-SPILSBURY M, RAMIREZ-NECOECHEA R, GONZALEZ-LOZANO M, MOTA-ROJAS D, TRUJILLO-ORTEGA ME. Piglet survival in early lactation: A review. *J Anim Vet Adv* 2007;6:76-86.
33. TSENG RJ, PADGETT DA, DHABHAR FS, ENGLER H, SHERIDAN JF. Stress-induced modulation of NK activity during influenza viral infection: role of glucocorticoids and oploids. *Brain Behav Immun* 2005;19:153-164.
34. KANITZ E, TUCHSCHERER M, PUPPE B, TUCHSCHERER A, STABENOW B. Consequences of repeated early isolation in domestic piglets (*Sus scrofa*) on their behavioural, neuroendocrine, and immunological responses. *Brain Behav Immun* 2004; 18:35-45.
35. WEARY DM, APPLEBY MC, FRASER D. Responses of piglets to early separation from the sow. *Appl Anim Behav Sci* 1999;63:289-300.
36. DE SOUZA TCR, LANDIN GM, GARCIA KE. Some physiological and nutritional factors affecting the incidence of post-weaning diarrhea in piglets. *Vet Méx* 2010;41:275-88.
37. DYBKJAER L, JACOBSEN AP, TOGERSEN FA, POULSEN HD. Eating and drinking activity of newly weaned piglets: Effects of individual characteristics, social mixing, and addition of extra zinc to the feed. *J Anim Sci* 2006;84:702-711.
38. WEARY DM, JASPER J, HOTZEL MJ. Understanding weaning distress. *Appl Anim Behav Sci* 2008;110:24-41.
39. HAY M, ORGEUR P, LEVY F, LE DIVIDICH J, CONCORDET D, NOWAK R *et al.* Neuroendocrine consequences of very early weaning in swine. *Phy & Behav* 2001;72:263-269.
40. KANITZ E, TUCHSCHERER M, TUCHSCHERER A, STABENOW B, MANTEUFFEL G. Neuroendocrine and immune responses to acute endotoxemia in suckling and weaned piglets. *Biol Neon* 2002;81:203-209.
41. PETERSEN V, SIMONSEN HB, LAWSON LG. The effect of environmental stimulation on the development of behavior in pigs. *Appl Anim Behav Sci* 1995;45:215-224.
42. RODARTE C. L. F., TRUJILLO-ORTEGA M. E., DOPORTO D. J. M., GALINDO M. F. A. Efecto de la manipulación ambiental sobre el comportamiento social, reactividad al humano y producción de lechones destetados a los 14 días de edad. *Vet Méx* 2005;36:375-380.
43. HICKS TA, MCGLONE JJ, WHISNANT CS, KATTESH HG, NORMAN RL. Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress. *J Anim Sci* 1998;76:474-83.
44. HESSEL EF, REINERS K, VAN DEN WEGHE HFA. Socializing piglets before weaning: Effects on behavior of lactating sows, pre- and postweaning behavior, and performance of piglets. *J Anim Sci* 2006;84:2847-55.
45. DAVIS ME, SEARS SC, APPLE JK, MAXWELL CV, JOHNSON ZB. Effect of weaning age and commingling after the nursery phase of pigs in a wean-to-finish facility on growth, and humoral and behavioral indicators of well-being. *J Anim Sci* 2006;84:743-56.
46. TRUJILLO-ORTEGA ME, MARTÍNEZ G, HERRADORA LMA. La piara reproductora. Mundi-Prensa, 2002.
47. THOMAS JF, RODERICK C. Segregated early weaning. *J Swine Health Prod* 1997;5:195-8.
48. HOTZEL MJ, MACHADO LCP, IRGANG R, ALEXANDRE L. Short-term behavioural effects of weaning age in outdoor-reared piglets. *Anim* 2010;4:102-7.
49. TORREY S, WIDOWSKI TM. Effect of drinker type and sound stimuli on early-weaned pig performance and behavior. *J Anim Sci* 2004;82:2105-14.
50. ROLDAN-SANTIAGO P, MOTA-ROJAS D, GUERREO-LEGARRETA I, MORA-MEDINA P, BORDERAS-TORDESILLAS F, ALARCON-ROJO AD *et al.* Animal welfare of barrows with different antemortem lairage times without food. *Vet Med-Czech* 2013;58:305-311.
51. WARRISS PD. Choosing appropriate space allowances for slaughter pigs transported by road: a review. *Vet Rec* 1998;142:449-54.
52. SUTHERLAND MA, MCDONALD A, MCGLONE JJ. Effects of variations in the environment, length of journey and type of trailer on the mortality and morbidity of pigs being transported to slaughter. *Vet Rec* 2009;165:13-8.
53. SUTHERLAND MA, KREBS N, SMITH JS, DAILEY JW, CARROLL JA, MCGLONE JJ. The effect of three space allowances on the physiology and behavior of weaned pigs during transportation. *Livest Sci* 2009;126:183-8.
54. COLLIN A, VAN MILGEN J, DUBOIS S, NOBLET J. Effect of high temperature and feeding level on energy utilization in piglets. *J Anim Sci* 2001;79:1849-57.
55. ARNAIZ V, ANDREA M, ALEXANDRE M, MARCOS R, SIOJI K. Efecto del peso al destete, temperatura ambiental y energía metabolizable del pienso en lechones recién destetados. *Rev Bras Ciên Agrár* 2009;4:472-8.
56. BAXTER EM, JARVIS S, SHERWOOD L, FARISH M, ROEHE R, LAWRENCE AB *et al.* Genetic and environmental effects on piglet survival and maternal behaviour of the farrowing sow. *Appl Anim Behav Sci* 2011;130:28-41.
57. OH HK, CHOI HB, JU WS, CHUNG CS, KIM YY. Effects of space allocation on growth performance and immune system in weaning pigs. *Livest Sci* 2010;132:113-8.
58. BRUININX E, SCHELLINGERHOUT AB, LENSEN EGC, VAN DER PEET-SCHWERING CMC, SCHRAMA JW, EVERTS H *et al.* Associations between individual food intake characteristics and indicators of gut physiology of group-housed weanling pigs differing in genotype. *Anim Sci* 2002;75:103-13.
59. VARLEY MA. El lechón recién nacido: desarrollo y supervivencia. Acribia, 1995.

60. DE SOUZA TCR, LANDIN GM, GARCIA KE, BARREYRO AA, BARRON AM. Nutritional changes in piglets and morphophysiological development of their digestive tract. *Vet Méx* 2012;43:155-73.
61. LE DIVIDICH J, SEVE B. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. *Domest Anim Endocrinol* 2000;19:63-74.
62. BRUININX E, VAN DER PEET-SCHWERING CMC, SCHRAMA JW, VEREIJKEN PFG, VESSEUR PC, EVERTS H *et al*. Individually measured feed intake characteristics and growth performance of group-housed weanling pigs: Effects of sex, initial body weight, and body weight distribution within groups. *J Anim Sci* 2001;79:301-8.
63. NESSMITH WB, NELSEN JL, TOKACH MD, GOODBAND RD, BERGSTROM JR, DRITZ SS *et al*. Evaluation of the interrelationships among lactose and protein sources in diets for segregated early-weaned pigs. *J Anim Sci* 1997;75:3214-21.
64. MCCracken BA, GASKINS HR, RUWEKAISER PJ, KLASING KC, JEWELL DE. Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning. *J Nutr* 1995;125:2838-45.
65. HERNANDEZ A, PLUSKE JR, D'SOUZA DN, MULLAN BP. Minimum levels of inclusion of copper and zinc proteinate amino acid chelates in growing and finishing pig diets. *Anim Prod Sci* 2009;49:340-9.
66. KIM JC, HANSEN CF, MULLAN BP, PLUSKE JR. Nutrition and pathology of weaner pigs: Nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. *Anim Feed Sci Tech* 2012;173:3-16.
67. BARNETT JL, CRONIN GM, MCCALLUM TH, NEWMAN EA. Effects of food and time of day on aggression when grouping unfamiliar adult-pigs. *Appl Anim Behavi Sci* 1994;39:339-47.
68. LAINE TM, LYYTIKAINEN T, YLIAHO M, ANTTILA M. Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. *Acta Vet Scand* 2008;50.
69. PRUNIER A, HEINONEN M, QUESNEL H. High physiological demands in intensively raised pigs: impact on health and welfare. *Animal* 2010;4:886-898.
70. FANGMAN TJ, TUBBS RC. Segregated early weaning. *J Swine Health Prod* 1997;5:195-198.
71. WIJTEN PJA, VAN DER MEULEN J, VERSTEGEN MWA. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. *Br J Nutr* 2011;105:967-981.
72. ENGLISH JGH, BILKEI G. The effect of litter size and littermate weight on pre-weaning performance of low-birth-weight piglets that have been cross-fostered. *Anim Sci* 2004;79:439-443.



Estudio coprológico y ultrasonográfico en perros y borregos de una comunidad suburbana en el Estado de México para la búsqueda de *Echinococcus* spp

Coprological and ultrasonographic study in dogs and sheep of a suburban community in the Estado de México in search of *Echinococcus* spp

Ulises Rodríguez-Prado* América Gutiérrez-Marín** Joel Martínez-Ocaña**
Mirza Romero-Valdovinos** Angélica Olivo-Díaz** Rigoberto Hernández-Castro**
Ana Flisser*** Pablo Maravilla** José-Juan Martínez-Maya*

Abstract

The study described here was performed in a suburban community of the Estado de México to *Echinococcus* spp, since a human case of cystic echinococcosis (CE) was identified previously. Overall, 91% (406/446) of the houses were visited and oral informed consent was obtained from dog owners; a questionnaire related to their dogs was applied and a coprological sample was obtained. It was found that 14% of dog owners fed them with raw livestock viscera. Coprological studies showed that eggs of *Ancylostoma* and *Toxocara* were the most abundant, thus deworming was recommended to all owners. Dogs with *Taenia* spp eggs were treated and *Taenia pisiformis* adults were released, not from *Echinococcus* spp. Most sheep in the community were studied by ultrasound and viscera of those slaughtered, were visually inspected; confirming the absence of CE. Interestingly, although no evidences of *Echinococcus* spp were found in animals, an autochthonous human case of CE was detected in 2006; this, added to proper practices for maintaining the life cycle of this parasite, suggests that echinococcosis in Mexico has a random behavioral pattern.

Key words: *ECHINOCOCCUS SPP*, CYSTIC ECHINOCOCCOSIS, INTESTINAL PARASITES, DOGS, ULTRASOUND

Resumen

El presente estudio se llevó a cabo en una comunidad suburbana del Estado de México para identificar *Echinococcus* spp, debido a que en un estudio previo se identificó un caso de equinococosis quística (EQ) humana. Se visitaron 91% (406/446) de las viviendas y se obtuvo el consentimiento verbal de los propietarios de perros; se aplicó un cuestionario relacionado con sus animales y se obtuvo una muestra de heces. Se encontró que 14% de los dueños de perros los alimentaban con vísceras crudas de animales de abasto; este resultado no tuvo significancia estadística. Los estudios coprológicos mostraron abundantes huevos de *Ancylostoma* y *Toxocara*, por lo que se recomendó a los propietarios la desparasitación de sus animales. Aquellos perros que tenían huevos de *Taenia* spp fueron desparasitados y se recuperaron adultos de *Taenia pisiformis*, no de *Echinococcus* spp. La mayoría de los borregos de la comunidad se estudiaron por ultrasonido, y las vísceras de aquéllos que fueron sacrificados se examinaron durante la necropsia; en ambos casos se confirmó la ausencia de EQ. Llama la atención que aunque no se encontraron evidencias de *Echinococcus* spp en animales, el antecedente de un caso humano autóctono de EQ, sumado a prácticas propicias para el mantenimiento del ciclo de vida de este parásito, sugieren que la equinococosis en México tiene un patrón de comportamiento aleatorio.

Palabras clave: *ECHINOCOCCUS SPP*; EQUINOCOCOSIS QUÍSTICA; PARÁSITOS INTESTINALES; PERROS; ULTRASONIDO

Recibido el 20 de junio de 2013 y aceptado el 13 de noviembre de 2013.

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México DF

**Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Calzada de Tlalpan 4800, Colonia Sección XVI, México 14080 México DF.

***Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México DF.

Responsable de correspondencia: Pablo Maravilla. E-mail: maravillap@yahoo.com. Tel/fax: 5255-55284228

Introduction

Several studies have been performed in Mexico in search of intestinal zoonotic parasites in dogs of urban and rural areas, especially those caused by *Ancylostoma* and *Toxocara*, since they can generate cutaneous and visceral *larva migrans*, respectively, in humans;¹⁻⁵ however, scarce information on *Echinococcus* spp in Mexican dogs exists. In studies conducted in the state of Zacatecas⁴ and in Mexico City³ positive samples were found, while no parasitized dogs has been found in the state of Yucatan.^{1,5}

Echinococcus granulosus sensu lato (s. l) is a complex of cestode species causing cystic echinococcosis (CE), one of the most important and widespread parasitic zoonoses. The larval stage or CE develops in viscera of ovine, bovine, porcine, equine and other mammals after they ingest eggs released by the definitive hosts (canids) in feces that contaminate grazing lands. Canine acquire the disease after ingesting contaminated viscera. Accidental consumption of *Echinococcus* spp eggs can cause hydatid disease in humans.⁶ The frequency of infected dogs is obtained in epidemiologic studies by treating dogs, for safety reasons, with praziquantel, a cestocidal drug, prior to purging with arecoline hydrobromide.^{6,7} Diagnosis of CE in animals is performed by ultrasound or by observation of viscera at necropsy; ultrasound has demonstrated to be very reliable for diagnosis and allows knowing the characteristics of the cysts.⁸⁻¹⁰

In an epidemiologic and ultrasonographic study of CE in humans performed in the same community in the Estado de México, where an autochthonous infection by *Echinococcus* was previously documented,¹¹ the prevalence of CE was 0.75% and the cases were distributed in the same sector of the community, suggesting the same exposure source.¹² The aim of this study was to investigate the presence of intestinal parasites, especially *Echinococcus* spp in dogs and CE in sheep in this community.

The study was performed in the first semester of 2005 in a suburban community of the Tepotzotlan municipality in the Estado de México, located at 19° 41' 44.25" N and 99° 15' 49.28" W, at 2,300 masl. Prior to fieldwork, the present study was reviewed and approved by the Comité de Ética e Investigación of the Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Overall, 91% of houses (406/446) were visited, oral informed consent was obtained and a questionnaire related to their dogs was applied. The questionnaire included breed, sex, living quarters, contact with people and ingestion of viscera. The amount of animals, slaughter place and destiny of viscera were asked in those houses having sheep, cows, pigs and horses. Fecal samples

Introducción

En México se han realizado varios estudios enfocados hacia la identificación de zoonosis por parásitos intestinales en perros de zonas urbanas y rurales, especialmente las causadas por *Ancylostoma* y *Toxocara*, ya que pueden generar, en humanos, síndromes de *larva migrans* cutánea y visceral, respectivamente;¹⁻⁵ sin embargo, existe escasa información sobre perros infectados con *Echinococcus* spp. En estudios realizados en el estado de Zacatecas⁴ y en la Ciudad de México³ se encontraron muestras positivas, mientras que en el estado de Yucatán no se encontró ningún perro parasitado.^{1,5}

Echinococcus granulosus, sensu lato (s l), es un complejo de especies de cestodos que causan equinococosis quística (EQ), una de las zoonosis parasitarias más importantes y generalizadas en el mundo. La etapa larvaria o EQ se desarrolla en las vísceras de ovinos, bovinos, porcinos, equinos y otros mamíferos después de que ingieren los huevos de este parásito, los cuales son expulsados en las heces de los hospederos definitivos (cánidos) y contaminan las tierras de pastoreo. Los cánidos adquieren la enfermedad después de que ingieren vísceras contaminadas. El consumo accidental de huevos de *Echinococcus* spp puede causar EQ en seres humanos.⁶ La frecuencia de perros infectados con gusanos adultos se determina mediante estudios epidemiológicos en los que se administra, por razones de seguridad, praziquantel como fármaco cestocida antes de purgar al perro con bromhidrato de arecolina.^{6,7} El diagnóstico de la EQ en los animales se lleva a cabo por ultrasonido o mediante la observación de las vísceras durante la necropsia. El ultrasonido ha demostrado ser muy confiable para el diagnóstico de esta enfermedad, además de que permite conocer las características de los quistes.⁸⁻¹⁰

Un estudio epidemiológico y ultrasonográfico de la EQ en seres humanos, realizado en una comunidad suburbana del Estado de México en la que se documentó previamente una infección autóctona por *Echinococcus* en un paciente,¹¹ mostró que la prevalencia de la EQ fue de 0.75% y los casos identificados se distribuyeron en el mismo sector de la comunidad, lo que sugirió una misma fuente de exposición.¹² El objetivo del presente estudio fue investigar la presencia de parásitos intestinales, especialmente *Echinococcus* spp, en perros y EQ en borregos de dicha comunidad.

El estudio se llevó a cabo durante el primer semestre de 2005 en una comunidad suburbana del municipio de Tepotzotlán, Estado de México, ubicado a 19° 41'44,25 "N y 99°15'49.28" O, a 2300 msnm. Antes del trabajo de campo, el presente estudio fue revisado y aprobado por el Comité de ética e investigación del

from dogs were obtained with a rectal spoon. Samples were kept cold in small-labeled flasks and transported to the central laboratory, where Faust flotation technique was performed. Dogs that had *Taenia* spp eggs received treatment with praziquantel (30 mg/kg) and after 30 min arecoline hydrobromide (6 mg/kg). During treatment dogs were confined for 30 minutes to 4 hours in cages, until tapeworms were recovered. CE was searched in living sheep by ultrasound, animals were restrained and their abdomens shaved in order to examine the hepatic area with a real time ultrasound equipment* using a 3.5 MHz transducer. Livers, lungs and kidneys were examined in animals that were slaughtered to verify the absence/presence of the *Echinococcus* cysts. Descriptive statistics were expressed in percentages and variables were analyzed by chi-squared test (X^2) for categorical variables using Epi Info 6.04 software.

A total of 414 dogs were recorded, 186 houses (42%) had at least one dog, the average being 2 per house with a range of 1 to 9; distribution of age, breed and sex is described in TABLE 1. Ratio of male to female dogs was 2:1; all dogs were allowed to be in the street, most of them (82%) always remained outside (in the entrance, the patio or the street) and 18% had access to the house. Only 14% of the dogs ate fresh livestock viscera, not corral poultry. Animals used for human consumption (186 sheep, 54 pigs and 52 cows) and horses (29) were found in 66 houses in which there were 99 dogs; the highest concentration of dogs and livestock was found in the most populated area of the community. No statistical association was found between variables.

One hundred sixty one (39%) out of the 414 dog fecal samples analyzed were positive for helminth eggs, *Ancylostoma* was found in 128 samples (31%), *Toxocara* in 26 samples (6%), *Taenia* in 4 samples (1%), *Capillaria* in 2 samples (0.5%) and *Trichuris* in 1 sample (0.2%). Some feces had more than one parasite species: 13 had *Ancylostoma-Toxocara* (3%), 1 had *Ancylostoma-Capillaria* (0.2%) and 1 had *Ancylostoma-Trichuris* (0.2%). *T. pisiformis* was found after treatment of 3 out of 4 dogs with *Taenia* eggs, while *Echinococcus* spp adults were not found. Albendazole was recommended to all owners of dogs harboring nematode parasites. None of the 42 sheep observed at sacrifice and none of the 186 sheep examined with ultrasound had *Echinococcus* cysts, one ovine had a nonparasitic liver abscess, confirmed after necropsy.

The present study was performed because an autochthonous case of *E. ortleppi* (*E. granulosus* s. l, G5) was reported in this community.¹¹ The community has 1,911 inhabitants in 375 households with 5 people per house in average. The results of this work showed a high concentration of dogs and livestock within the

Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Se visitó 91% de las viviendas (406/446), en las que se obtuvo consentimiento verbal de los dueños para aplicar un cuestionario relacionado con los perros. El cuestionario incluía: raza, sexo, características de la vivienda, contacto con la gente e ingestión de vísceras. Se investigó la cantidad de animales, lugar de sacrificio y el destino de las vísceras en las casas con borregos, vacas, cerdos y caballos. Asimismo, se obtuvieron muestras fecales de los perros mediante una cucharilla rectal. Las muestras se conservaron en cadena fría en contenedores de plástico debidamente rotulados con los datos de identificación de cada animal, las muestras se trasladaron al laboratorio central, donde se les realizó la técnica de flotación de Faust. Los perros identificados con huevos de *Taenia* spp fueron tratados con praziquantel (30 mg/kg) y después de 30 min se les administró bromhidrato de arecolina (6 mg/kg). Durante el tratamiento, los perros fueron confinados en jaulas de 30 min a 4 h, hasta que expulsaron los cestodos. La mayoría de los borregos de la comunidad se estudiaron por ultrasonido para identificar EQ; se sujetaron los animales y se les rasuró el abdomen para examinar la zona hepática con un equipo de ultrasonido en tiempo real* con un transductor de 3.5 MHz. En los animales que se sacrificaron se revisó el hígado, los pulmones y los riñones para verificar la ausencia/presencia de quistes de *Echinococcus*. Se llevó a cabo la estadística descriptiva en porcentajes y las variables fueron analizadas por pruebas de X^2 para las variables categóricas, utilizando el software Epi Info 6.04.

Se registró un total de 414 perros; en 186 viviendas (42%) tenían al menos un perro, y el promedio fue de 2 animales por casa con un intervalo de 1 a 9; la distribución de la edad, raza y sexo se describen en el CUADRO 1. La proporción de machos y hembras fue de 2:1, todos los perros tenían acceso a la calle, la mayoría (82%) siempre se mantuvo fuera de la casa (en la entrada, el patio o la calle), y el 18% tenía acceso a la casa. Sólo 14% de los perros comían vísceras frescas de animales de abasto, no de aves de corral. Los domicilios en los que se concentró la mayoría de los animales destinados para el consumo humano (186 ovejas, 54 cerdos y 52 vacas) y caballos (29) fueron 66 casas, en las cuales había 99 perros; la mayor concentración de perros y ganado se registró en la zona más poblada de la comunidad. No se encontró asociación estadística entre las variables estudiadas.

De las 414 muestras de heces de perros, 39% (161) tenía huevos de helmintos. Se encontró *Ancylostoma* en 128 muestras (31%), *Toxocara* en 26 muestras (6%), *Taenia* en 4 muestras (1%), *Capillaria* en 2 muestras

*Aloka SSD 500, Japón

CUADRO 1

Distribución (%), por edad y raza, de perros machos y hembras estudiados en la comunidad.

Distribution (%) of age and breed of male and female dogs found in the community

	Total	Age			Breed	
		< 1 year	1<5 years	>5 years	Pure	Mixed
Male	64.3	20.1	32.1	12.1	35.3	28.9
Female	35.7	13.5	16.2	6.0	25.2	10.6
Total (414)	100	33.6	48.3	18.1	60.5	39.5

most populated area of the community, where one dog for each four people was found. Coprologic studies showed that the most abundant eggs were from *Ancylostoma* and *Toxocara*, zoonotic parasites; therefore, deworming was recommended to all owners, since environmental contamination with eggs released in dog feces is an important factor in the spread of the parasite.

Almost half of the houses had dogs, which reflects the interest of people for owning dogs¹³ and, as the results of this paper and others previously reported,¹⁴ people prefer to have male than female dogs. Dogs under 1 year of age have higher risk of acquiring helminth infections;¹⁵⁻¹⁷ although, in the present study, one third of canine population was in this age and many of them were parasitized, no significant association was found ($P > 0.05$); in addition, around half of the resident female dogs were in reproductive age, potentially increasing the puppy population. Similar findings were reported in a study conducted in urban dogs from Iran.¹⁷

Adults of *Echinococcus* spp were not found in dogs of the community, in spite of the fact that an autochthonous case of human liver echinococcosis was not long ago described.¹¹ Lack of sensitivity of Faust technique could be argued, but several authors indicate that if a dog ingests only one *Echinococcus* cyst, it can develop up to 13,000 adult parasites and may release 150,000 eggs per day, which become easily evident in copro-parasitoscopic analysis.^{6,18} Therefore, the dog that had tapeworm eggs but was negative after purging, could be due to spontaneous release of the tapeworm. Furthermore, no *Echinococcus* cysts were found in sheep after slaughter and by ultrasound. The reliability of ultrasound for diagnosis has been documented⁸⁻¹⁰ and is consistent with the nonparasitic liver abscess that was confirmed at necropsy.

The possible explanation for the absence of *E. granulosus* s. l. in the community, in spite of the identification of a human case of echinococcosis, is timing, since symptomatology in humans usually appears many

(0,5%) y *Trichuris* en 1 muestra (0,2%). Algunos perros estaban parasitados con más de una especie de helminto: 13 tenían *Ancylostoma-Toxocara* (3%), 1 tenía *Ancylostoma-Capillaria* (0,2%) y 1, *Ancylostoma-Trichuris* (0,2%). Se encontró *T. pisiformis* después de administrar el tratamiento antiparasitario en 3 de los 4 perros con huevos de *Taenia*; no se encontraron gusanos adultos de *Echinococcus* spp. A todos los propietarios de perros que tenían nematodos gastrointestinales se les recomendó la administración de tratamiento antiparasitario con albendazol. En ninguna de las 42 ovejas cuyas vísceras se examinaron durante su necropsia, así como en las 186 examinadas con ultrasonido, se identificaron quistes de *Echinococcus*; en un borrego se identificó, por ultrasonido, un absceso hepático no parasitario, el cual fue confirmado durante la necropsia.

El presente estudio se llevó a cabo en la comunidad en la que previamente se había identificado un caso de *E. ortleppi* (*E. granulosus* s. l, G5).¹¹ La comunidad cuenta con 1.911 habitantes y 375 hogares con 5 personas por hogar, en promedio. Los resultados del presente estudio mostraron una alta concentración de perros y ganado en la zona más poblada de la comunidad, en la que había un perro por cada cuatro personas. Los estudios coprológicos mostraron que los huevos más abundantes fueron de *Ancylostoma* y *Toxocara*, que son parásitos zoonóticos, por lo que se recomendó a los propietarios la desparasitación de sus animales, dado que un factor importante para la propagación de estos parásitos es la contaminación del medio ambiente con huevos expulsados en las heces de los perros.

En casi la mitad de las casas había perros, lo que refleja el interés de la gente por ser dueña de un canino¹³ y, como lo muestran los resultados de éste y otros trabajos,¹⁴ las personas prefieren tener perros machos que hembras. Los perros menores de 1 año de edad tienen un mayor riesgo de adquirir infecciones por helmintos;¹⁵⁻¹⁷ aunque en el presente estudio un tercio de la población canina eran cachorros de esta edad y muchos de ellos estaban parasitados, no se encontró una asociación significativa ($P > 0,05$); además,

years after infection⁶ and dog substitution is common in these communities. Nevertheless, conditions that favor the biotic potential of *Echinococcus* and other zoonotic parasites becomes evident from the permanent interaction of dogs with cattle and with children, lack of dog deworming, dogs fed fresh viscera and indiscriminate disposal of dog feces.^{8,19} On the other hand, it is possible that some of these risk practices, particularly feeding dogs with infected viscera, was uncommon, because livestock viscera is highly required for Mexican traditional food, diminishing the access of dogs to viscera and interrupting the parasite transmission. Interestingly, although no evidences of *Echinococcus* spp were found in animals, an autochthonous human case of CE was detected in 2006; this, added to proper practices for maintaining the life cycle of this parasite, suggests that echinococcosis in Mexico has a random behavioral pattern.

Acknowledgments

Special thanks to the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) for its financial support (PAPIIT/UNAM IN218503), subsidizing the fieldwork for dog fecal analysis and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, SNI/2543) for the scholarship granted to América Gutiérrez-Marín.

References

1. RODRÍGUEZ-VÍVAS RI, COB G, DOMÍNGUEZ A. Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatán, México. *Rev Biomed* 2001; 12:19-25.
2. FERNÁNDEZ CF, CANTÓ AGJ. Frecuencia de helmintos en intestinos de perros sin dueño sacrificados en la ciudad de Querétaro, Querétaro, México. *Vet Méx* 2002; 33:247-53.
3. EGUÍA-AGUILAR P, CRUZ-REYES A, MARTÍNEZ-MAYA JJ. Ecological analysis and description of the intestinal helminths in dogs in Mexico City. *Vet Parasitol* 2005; 127:139-46.
4. MARTÍNEZ-MAYA JJ, ZÚÑIGA AI, JARAMILLO ACJ, CÁRDENAS LJ, NAVARRO FR. Caracterización epidemiológica de la equinococosis/hidatidosis en Zacatecas, México. *Vet Méx* 1994; 25: 231-37.
5. RODRÍGUEZ-VIVAS RI, GUTIERREZ-RUIZ E, BOLIO-GONZÁLEZ ME, RUIZ-PIÑA H, ORTEGA-PACHECO A, REYES-NOVELO E *et al.* An epidemiological study of intestinal parasites of dogs from Yucatan, Mexico, and their risk to public health. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11:1141-4.
6. ECKERTJ, GEMMELMA, MESLINFX, PAWLOWSKI ZS. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global

alrededor de la mitad de las perras residentes estaban en edad reproductiva, lo que potencialmente podría aumentar la población de cachorros. Resultados similares se encontraron en un estudio desarrollado en perros urbanos de Irán.¹⁷

La ausencia de gusanos adultos de *Echinococcus* spp en los perros de la comunidad contrasta con el caso de equinococosis hepática humana que se describió no hace mucho tiempo.¹¹ Este hecho podría justificarse con base en la falta de sensibilidad de la técnica de Faust, pero algunos estudios muestran que si un perro ingiere un solo quiste de *Echinococcus*, el animal puede desarrollar hasta 13,000 parásitos adultos y liberar 150.000 huevos en sus heces al día, los cuales se identifican fácilmente en los estudios coproparasitoscópicos.^{6,18} Por ello, el caso del perro que tuvo huevos de tenia, pero que fue negativo después de la purga, podría explicarse por la liberación espontánea del parásito. Asimismo, no se encontraron quistes de *Echinococcus* en los ovinos después de la necropsia ni por ultrasonido. La confiabilidad del ultrasonido en el diagnóstico ha sido documentada,⁸⁻¹⁰ y es congruente con el hallazgo del absceso hepático no parasitario que se confirmó a la necropsia.

La posible explicación en sentido estricto, para la ausencia de *E. granulosus* en la comunidad, a pesar de la identificación de un caso humano de equinococosis, es el tiempo, ya que la sintomatología en los seres humanos por lo general aparece muchos años después de la infección.⁶ Sin embargo, las condiciones que favorecen el potencial biótico de *Echinococcus* y otros parásitos zoonóticos se hace evidente a partir de la interacción permanente de los perros con el ganado y con los niños, la falta de desparasitación de los perros, su alimentación con vísceras frescas y la eliminación indistinta de las heces de los perros.^{8,19} Por otro lado, es posible que algunas prácticas de riesgo, particularmente la de alimentar a los perros con vísceras infectadas, sea poco frecuente, porque las vísceras de los animales de abasto tienen una gran demanda comercial dentro de la comida tradicional mexicana, por lo que los perros tendrían un acceso restringido a las vísceras, lo que interrumpiría la transmisión del parásito. Llama la atención que aunque no se encontró evidencia de *Echinococcus* spp en animales, hubo un caso humano autóctono de EQ detectado en 2006; lo que, sumado a prácticas propicias para el mantenimiento del ciclo de vida de este parásito, sugiere que la equinococosis en México tiene un patrón de comportamiento aleatorio.

Agradecimientos

Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo brindado

Concern. Paris: World Organization for Animal Health, 2001.

7. SCHANTZ PM. Guía para el empleo de bromhidrato de arecolina en el diagnóstico de la infección por *Echinococcus granulosus* en el perro. Bol Chil Parasitol 1973; 28: 81-90.
 8. CARMONA CR, PERDOMO A, CARBO C, ALVAREZ J, MONTI R, GRAUERT D *et al.* Risk factors associated with human cystic echinococcosis in Florida, Uruguay: results of a mass screening study using ultrasound and serology. Am J Trop Med Hyg 1998; 58: 599-605.
 9. MACPHERSON CNL, BARTHOLOMOT B, FRIDER B. Application of ultrasound in diagnosis, treatment, epidemiology, public health and control of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. Parasitology 2003; 127: S21-S35.
 10. LAHMAR S, CHÉHIDA FB, PÉTAVY AF, HAMMOU A, LAHMAR J, GHANNAY A *et al.* Ultrasonographic screening for cystic echinococcosis in sheep in Tunisia. Vet Parasitol 2007; 143: 42-9.
 11. MARAVILLA P, THOMPSON RCA, PALACIOS R, ESTCOURT A, RAMIREZ S, MONDRAGÓN C *et al.* *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. Act Trop 2004; 92: 231-36.
 12. MATA-MIRANDA P, OSNAYA-PALMAI I, RODRÍGUEZ-PRADO U, GUTIÉRREZ-MARÍN A, TAWIL M, HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ S *et al.* Epidemiologic and ultrasonographic study of echinococcosis in a community in the state of Mexico. Am J Trop Med Hyg 2007; 77: 500-03.
-
13. SERPELL J. The domestic dogs. Its evolution, behavior and interactions with people. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1995.
 14. ORIHUELA TA, SOLANO VJ. Demographics of the owned dog population in Miacatlán, Morelos, México. Anthrozoos 1995; 8: 171-75.
 15. SAVILLA TM, JOY JE, MAY JD, SOMERVILLE CC. Prevalence of dog intestinal nematode parasites in south central West Virginia, USA. Vet Parasitol 2011; 178: 115-20.
 16. JOFFE D, VAN NIEKERK D, GAGNÉ F, GILLEARD J, KUTZ S, LOBINGIER R. The prevalence of intestinal parasites in dogs and cats in Calgary, Alberta. Can Vet J 2011; 52: 1323-28.
 17. MIRZAEI M, FOOLADI M. Prevalence of intestinal helminths in owned dogs in Kerman city, Iran. Asian Pac J Trop Med 2012; 5: 735-37.
 18. TORGERSON PR, HEATH DD. Transmission dynamics and control options for *Echinococcus granulosus*. Parasitology 2003; 127: S143-S158.
 19. BUDKE MC, CAMPOS PM, WANG Q, TORGERSON PR. A canine purgation study and risk factor analysis for echinococcosis in a high endemic region of the Tibetan plateau. Vet Parasitol 2005; 127: 43-49.

mediante el proyecto PAPIIT/UNAM IN218503, que permitió subvencionar el trabajo de campo para el análisis coprológico de los perros; al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) SNI/2543, por la beca otorgada a América Gutiérrez Marín.