



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Comparación entre un ELISA competitivo y un ELISA indirecto para el diagnóstico de *Lawsonia intracellularis* en porcino de cebo

Joaquín Vázquez Sanmartín

Grado en Veterinaria

Año 2025

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Joaquín Vázquez Sanmartín y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



1. RESUMEN:

La enteropatía proliferativa porcina es una de las enfermedades digestivas que afectan al ganado porcino más prevalente en el mundo. Esta enfermedad está causada por *Lawsonia intracellularis*, una bacteria intracelular obligada cuya transmisión se ve favorecida por una mala higiene, así como por la presencia de fómites contaminados y vectores como los roedores. Aunque puede provocar cuadros clínicos graves, la forma más frecuente es subclínica, lo que unido a la eliminación intermitente de bacteria en heces dificulta su diagnóstico. La importancia de esta enfermedad para el sector porcino recae sobre todo en las graves pérdidas económicas que supone, y que se derivan principalmente de la disminución del rendimiento productivo del animal así como del aumento del coste derivado del control.

Debido a la eliminación intermitente del patógeno en las heces de los animales infectados junto a que normalmente cursa de forma subclínica, el diagnóstico mediante métodos serológicos de tipo indirecto cobra especial relevancia. Por este motivo, los objetivos del presente trabajo fueron, por un lado, comparar dos formatos comerciales de ELISA para detección de anticuerpos, uno de tipo competición frente a otro de tipo indirecto tradicional, para la clasificación sanitaria de animales en relación con la infección por *Lawsonia intracellularis*, y por otro lado, discutir la utilidad de ambos métodos para la monitorización serológica de esta infección en animales de cebo.

Para ello se utilizaron 180 muestras de suero de animales de tres cebaderos diferentes, los cuales se habían llenado desde un mismo origen. Cada cebadero se visitó tres veces, recogiendo muestras de 20 animales a las 14, 16 y 18 semanas de vida. Posteriormente, las muestras fueron analizadas con cada kit comercial de ELISA y los resultados fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de McNemar y el índice *Kappa* de Cohen.

Los resultados obtenidos muestran una discordancia significativa entre ambos kits (p -valor $<0,0001$ en la prueba de McNemar), con un índice *Kappa* de 0,077 y un acuerdo observado del 45% lo que se corresponde con una concordancia muy pobre. Debido a esto, se hace necesario contrastar las pruebas ELISA estudiadas con una técnica de referencia que permita valorar objetivamente cuál de estas técnicas presenta una mayor validez diagnóstica para la clasificación sanitaria de animales con respecto a esta infección. En relación con la monitorización serológica de cada cebadero, los resultados sugieren que posiblemente el ELISA de competición pueda ser más útil para este objetivo en comparación con el ELISA indirecto, aunque hay que tener en cuenta por un lado la falta de acuerdo observada entre ambos kits y por otro lado el hecho de que sería también necesario corroborar dicha hipótesis mediante la realización de un muestreo representativo que aumente la precisión de los resultados.

Palabras clave: *Lawsonia intracellularis*, porcino, ELISA, cebadero, concordancia.

RESUMO:

A enteropatía proliferativa porcina é unha das enfermidades dixestivas que afectan ao gando porcino máis prevalentes no mundo. Esta enfermidade está causada por *Lawsonia intracellularis*, unha bacteria intracelular obrigatoria cuxa transmisión se ve favorecida por unha hixiene deficiente, así como pola presenza de fómites contaminados e vectores como os roedores. Aínda que pode provocar cadros clínicos graves, a forma máis frecuente é subclínica, o que, unido á eliminación intermitente da bacteria nas feces, dificulta o seu diagnóstico. A importancia desta enfermidade para o sector porcino reside sobre todo nas graves perdas económicas que supón, derivadas principalmente da diminución do rendemento produtivo do animal así como do aumento do custo asociado ao control.

Debido á eliminación intermitente do patóxeno nas feces dos animais infectados e ao feito de que normalmente cursa de forma subclínica, o diagnóstico mediante métodos serolóxicos de tipo indirecto cobra especial relevancia. Por este motivo, os obxectivos do presente traballo foron, por unha banda, comparar dous formatos comerciais de ELISA para a detección de anticorpos, un de tipo competición fronte a outro de tipo indirecto tradicional, para a clasificación sanitaria dos animais en relación coa infección por *Lawsonia intracellularis*, e por outra banda, discutir a utilidade de ambos métodos para a monitorización serolóxica desta infección en animais de ceba.

Para iso utilizáronse 180 mostras de soro de animais de tres cebadeiros diferentes, os cales foran enchidos desde unha mesma orixe. Cada cebadeiro foi visitado tres veces, recolléndose mostras de 20 animais ás 14, 16 e 18 semanas de vida. Posteriormente, as mostras foron analizadas con cada kit comercial de ELISA e os resultados foron analizados estatisticamente mediante a proba de McNemar e o índice *Kappa* de Cohen.

Os resultados obtidos mostran unha discordancia significativa entre ambos kits (p-valor < 0,0001 na proba de McNemar), cun índice *Kappa* de 0,077 e un acordo observado do 45 %, o que se corresponde cunha concordancia moi pobre. Debido a isto, faise necesario contrastar as probas ELISA estudadas cunha técnica de referencia que permita valorar obxectivamente cal destas técnicas presenta unha maior validez diagnóstica para a clasificación sanitaria dos animais con respecto a esta infección. En relación coa monitorización serolóxica de cada cebadeiro, os resultados suxiren que posiblemente o ELISA de competición poida ser máis útil para este obxectivo en comparación co ELISA indirecto, aínda que hai que ter en conta, por unha banda, a falta de acordo observada entre ambos kits e, por outra, o feito de que tamén sería necesario corroborar esta hipótese mediante a realización dunha mostraxe representativa que aumente a precisión dos resultados.

Palabras chave: *Lawsonia intracellularis*, porcino, ELISA, cebadeiro, concordancia.

ABSTRACT:

Proliferative enteropathy in pigs is one of the most prevalent digestive diseases affecting swine livestock worldwide. This disease is caused by *Lawsonia intracellularis*, an obligate intracellular bacterium whose transmission is favored by poor hygiene, as well as the presence of contaminated fomites and vectors such as rodents. Although it can cause severe clinical symptoms, the most common form is subclinical, which, combined with intermittent shedding of the bacteria in feces, makes diagnosis difficult. The significance of this disease for the swine industry lies mainly in the serious economic losses it causes, primarily due to reduced animal productivity and increased control-related costs.

Because of the intermittent shedding of the pathogen in the feces of infected animals and the fact that it usually presents subclinically, indirect serological diagnostic methods are particularly relevant. For this reason, the objectives of this study were, on the one hand, to compare two commercial ELISA formats for antibody detection, one based on a competitive format and the other on a traditional indirect format, to assess the health status of animals regarding *Lawsonia intracellularis* infection, and on the other hand, to discuss the usefulness of both methods for serological monitoring of this infection in fattening pigs.

To this end, 180 serum samples were collected from animals in three different fattening farms, all populated from the same origin. Each farm was visited three times, and samples were collected from 20 animals at 14, 16, and 18 weeks of age. The samples were then analyzed using each commercial ELISA kit, and the results were statistically analyzed using McNemar's test and Cohen's *Kappa* index.

The results showed a significant discrepancy between the two kits (p-value < 0.0001 in McNemar's test), with a *Kappa* index of 0.077 and an observed agreement of 45%, indicating very poor concordance. Because of this, it is necessary to validate the ELISA tests used against a reference method to objectively assess which of these techniques offers greater diagnostic validity for classifying animals with respect to this infection. Regarding the serological monitoring of each farm, the results suggest that the competitive ELISA may be more useful for this purpose compared to the indirect ELISA. However, it is important to consider both the lack of agreement between the two kits and the need to confirm this hypothesis through a representative sampling that improves result accuracy.

Key words: *Lawsonia intracellularis*, swine, ELISA, fattening farm, agreement.

2.ÍNDICE:

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN: | 3 |
| 2. ÍNDICE:..... | 6 |
| 2.1. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS: | 7 |
| 3. ABREVIATURAS: | 8 |
| 4. INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| 4.1. Enteropatía proliferativa porcina y su importancia para el sector. | 9 |
| 4.2. Etiología. | 10 |
| 4.3. Epidemiología. | 10 |
| 4.4. Patogenia. | 12 |
| 4.5. Signos clínicos y lesiones. | 12 |
| 4.6. Diagnóstico. | 13 |
| • Técnicas directas:..... | 13 |
| • Técnicas indirectas:..... | 15 |
| 4.7. Tratamiento, prevención y control. | 18 |
| 5. OBJETIVOS | 21 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS | 22 |
| 6.1 Origen de los animales y toma de muestras..... | 23 |
| 6.2 Análisis de laboratorio. | 23 |
| • 6.2.1 ELISA de competición. | 23 |
| • 6.2.2 ELISA indirecto:..... | 25 |
| 6.3 Análisis estadístico:..... | 26 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 27 |
| 7.1 Comparación entre kits de ELISA..... | 27 |
| 7.2 Dinámica serológica frente a <i>Lawsonia intracellularis</i> con cada kit ELISA en diferentes granjas:..... | 30 |
| 8. CONCLUSIONES:..... | 34 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA:..... | 35 |

2.1 ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS:

FIGURAS:

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ejemplo del funcionamiento de la FCAT. | 16 |
| Figura 2. Ejemplo del funcionamiento del indirecto | 17 |
| Figura 3. Ejemplo del funcionamiento del ELISA de competición | 18 |
| Figura 4. Susceptibilidad a antimicrobianos de <i>Lawsonia intracellularis</i> | 19 |
| Figura 5. Número de sueros positivos y negativos con cada kit ELISA | 27 |
| Figura 6. Porcentaje de cerdos seropositivos a <i>Lawsonia intracellularis</i> con el kit A en cada granja y en cada visita | 30 |
| Figura 7. Porcentaje de cerdos seropositivos a <i>Lawsonia intracellularis</i> con el kit B en cada granja y en cada visita..... | 31 |

TABLAS:

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Prevalencia de <i>Lawsonia intracellularis</i> en las explotaciones de cerdos antes de 2010 y después de 2019. | 11 |
| Tabla 2. Resumen de las características de las vacunas..... | 19 |
| Tabla 3. Valoración del índice <i>Kappa</i> | 26 |
| Tabla 4. Tabla de contingencia con los resultados obtenidos de cada kit ELISA | 28 |

3. ABREVIATURAS:

- DOM control negativo: Densidad óptica media del control negativo.
- DOM control positivo: Densidad óptica media del control positivo.
- DO muestra: Densidad óptica de la muestra.
- ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensayos Inmunoabsorbentes Ligados a Enzimas)
- EPP: Enteropatía Proliferativa Porcina
- FCAT :Prueba de Anticuerpos por Citometría de Flujo
- GMD: Ganancia media diaria
- IC: Índice de conversión
- IFI: inmunofluorescencia Indirecta
- IFD: Inmunofluorescencia Directa
- IHC: Inmunohistoquímica
- IPMA: Ensayo de monocapa de inmunoperoxidasa
- PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa).
- PHE: Enteropatía hemorrágica proliferativa
- PIA: Adenomatosis intestinal porcina
- PI: Porcentaje de Inhibición
- PP: Porcentaje de Positividad
- qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa)
- WS: Warthin- Starry

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Enteropatía proliferativa porcina y su importancia para el sector.

La enteropatía proliferativa porcina es una de las enfermedades entéricas porcinas con mayor prevalencia en todo el mundo. Esta enfermedad también es conocida como la ileítis porcina, aunque hoy en día se sabe que no solo afecta al íleon sino a todo el aparato digestivo (Rodríguez-Vega *et al.*, 2024).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en cerdos en 1931, pero se limitaba a casos ocasionales diagnosticados como enfermedad aguda o crónica. Llegados a la década de 1970, fue cuando por primera vez se describió la naturaleza de la enfermedad al visualizar la presencia de una especie de bacteria intracelular, aunque no fue hasta la época de los 90 cuando por primera vez se consiguió cultivar e identificar el agente causal, la bacteria *Lawsonia intracellularis* (Rodríguez-Vega *et al.*, 2024; Vannucci & Gebhart, 2014).

La importancia de esta enfermedad se basa en que es una de las enfermedades digestivas más prevalentes en las explotaciones porcinas a nivel mundial, afectando a la salud de los animales y causando una gran disminución del rendimiento productivo de los animales, lo cual repercute en grandes pérdidas económicas para el sector porcino de producción. Estas pérdidas económicas, aunque varían de un país a otro, vienen principalmente provocadas por la disminución en la ganancia de peso diaria (GMD) así como el aumento del índice de conversión alimenticia (IC), del uso de medicamentos y gastos veterinarios y también de la tasa de mortalidad (Arnold *et al.*, 2019; Resende *et al.*, 2015).

En estudios de cerdos infectados por *Lawsonia intracellularis* mayores de 6 semanas, lo cual semeja lo más parecido a la infección que se contrae en el campo, se describe un descenso de la GMD entre el 3-19% y un aumento del IC en torno al 7%. Además de las pérdidas producidas por la disminución del rendimiento productivo del animal, hay que sumarle las pérdidas por coste de tratamientos, gastos veterinarios, gastos de prevención y control, así como los gastos de reposición en el caso de que exista mortalidad. Como ejemplo, en España se han descrito pérdidas de entre 5-20 € por cada cerdo afectado, en Alemania un descenso del 1,2% de los beneficios de la granja, en el Reino Unido alrededor de 2-7 £ por cerdo y en Dinamarca 1,5-3 \$ por cada cerdo destetado (Arnold *et al.*, 2019).

4.2. Etiología.

Lawsonia intracellularis es una bacteria Gram negativa intracelular obligada, perteneciente desde un punto de vista taxonómico al filo *Proteobacteria*, al orden *Desulfovibrionales* y a la familia *Desulfovibrionaceae* (Vannucci & Gebhart, 2014).

Se caracteriza por ser una bacteria con poca variabilidad, pero presenta una larga resistencia ambiental, pudiendo volver a aparecer después de años sin causar signos clínicos de enfermedad. Esto es posible, debido a que la bacteria *Lawsonia intracellularis* es capaz de mantenerse viable a una temperatura ambiente en torno a los 15°C durante al menos un período de dos semanas (Guedes, 2019).

4.3. Epidemiología.

Se trata de una enfermedad que afecta principalmente al ganado porcino, pudiendo provocar también signos clínicos a otros hospedadores como caballos (en los que causa la enteropatía proliferativa equina), conejos, ratas, ovejas o zorros. Desde un punto de vista de Salud Pública este proceso no se considera una zoonosis, dado que no se ha descrito ninguna enfermedad relacionada con el hombre (Jacobson, *et al.*, 2010).

La enteropatía proliferativa porcina se encuentra extendida mundialmente, afectando prácticamente a todas las granjas de producción porcina independientemente del sistema de producción. Esta infección hoy en día está afectando a más del 90% de las explotaciones europeas, donde se considera una enfermedad endémica: estudios recientes señalan que el porcentaje de granjas positivas detectado mediante qPCR alcanza el 83,3% en España, 79,2% en Francia, 91,7% en Alemania, 95,8% en Dinamarca, 91,7% en países Bajos e incluso del 100% en Reino Unido (Arnold *et al.*, 2019; Baldasso *et al.*, 2023; Rodríguez-Vega *et al.*, 2024).

Como se puede ver, la prevalencia de esta enfermedad se encuentra en valores muy elevados superando el umbral del 80% en nuestro país. En estudios realizados a principios de la década de los años 2000, estas prevalencias ya se encontraban muy elevadas en los países de la Unión Europea, no siendo inferior al 94 %. En un estudio más reciente (Baldasso *et al.*, 2023), se sigue demostrando que esta prevalencia, aunque en niveles más bajos (media del 90,28%), se encuentra todavía en niveles muy elevados en las explotaciones de producción porcina (Tabla 1).

Adicionalmente, en países fuera de la Unión Europea los porcentajes de explotaciones positivas también son elevados: por ejemplo, en China se detectó la presencia de la bacteria en el 93,6 %

de las granjas, mientras que en Corea y en los Estados Unidos se encontraron anticuerpos séricos en el 100% y el 90,4 % de las explotaciones respectivamente (Rodríguez-Vega *et al.*, 2024).

Tabla 1. Prevalencia de *Lawsonia intracellularis* en las explotaciones de cerdos antes de 2010 y después de 2019. Fuente: (THardge *et al.*, 2005; Baldasso *et al.*, 2023).

| País | Prevalencia de <i>Lawsonia intracellularis</i> en explotaciones de cerdos < 2010 | Prevalencia de <i>Lawsonia intracellularis</i> en explotaciones de cerdos en 2019 |
|----------------------|--|---|
| España | 95% | 83,3 % |
| Francia | 94 % | 79, 2 % |
| Alemania | 96,5 % | 91,7 % |
| Reino Unido | 95 % | 100 % |
| Holanda | 94 % | 91,7 % |
| Dinamarca | 100 % | 95,8 % |
| Media Europea | 95,75 % | 90,28 % |

Respecto a la forma de transmisión de esta bacteria, la principal forma es por vía directa, a través de las heces de los animales infectados. La introducción de la enfermedad en un rebaño está asociada a la compra de cerdos infectados; una vez dentro de la granja, el patógeno puede persistir por varios motivos, siendo uno de los principales la falta de una limpieza y desinfección eficaz de las instalaciones (Rodríguez-Vega *et al.*, 2024). Entre otros motivos por los cuales se puede mantener la infección en una granja podemos destacar (Jacobson *et al.*, 2010; Rodríguez-Vega *et al.*, 2024):

- Mezcla de animales de diferentes explotaciones y edades.
- Contacto directo a través de la vía oro fecal.
- Fómites como botas contaminadas con heces.
- Vectores biológicos como pájaros y ratones.
- Vía vertical, desde madres a lechones, las cuales son portadoras subclínicas.
- Movimientos de animales portadores.

La eliminación de la bacteria en heces se produce desde la primera semana postinfección hasta las cuatro semanas después de la infección. La susceptibilidad de la infección es mayor en los lechones cercanos a las seis semanas de vida, y tras la infección se produce una seroconversión entorno a dos semanas después (Resende *et al.*, 2015). Algunas de las principales dificultades para el control de la enfermedad es que la excreción del patógeno en heces es intermitente, sobre todo en los animales jóvenes, lo que dificulta poder identificar los animales portadores y, además, se trata de un patógeno que presenta una baja dosis mínima infectiva, lo que facilita la infección de los animales susceptibles (Arnold *et al.*, 2019).

Se ha demostrado que muchas especies de animales silvestres excretan *L. intracellularis* en las heces, aunque la mayoría de ellas no son relevantes para la transmisión a los cerdos. Sin

embargo, cabría destacar una de las especies que sí puede causar problemas en relación a la aparición y mantenimiento de esta enfermedad en la producción porcina que son los roedores, los cuales se encuentran presentes en las granjas y pueden infectarse con heces de cerdos enfermos de ileítis, transmitiendo la bacteria a lechones susceptibles a través de sus propias heces (Guedes, 2019).

4.4. Patogenia.

La ileítis porcina está caracterizada por producir un engrosamiento de la pared del íleon, debido principalmente a la infección de las células epiteliales indiferenciadas de las criptas intestinales de la parte distal de este tramo. Esto provoca en el animal una proliferación anormal de estas, lo cual acaba provocando la lisis de los enterocitos. Así, los enterocitos se sustituyen por células inmaduras, las cuales van a contar con una menor capacidad de absorción de los nutrientes y van a producir un engrosamiento del epitelio intestinal, principalmente en el íleon, pero que puede extenderse a las regiones de ciego y colon (Vannucci F. *et al.*, 2019).

De esta forma, el tramo de intestino afectado va a perder parte de su capacidad de absorción al encontrarse hiperplásico y/o engrosado, lo que conducirá finalmente a un retraso en el crecimiento de los animales.

4.5. Signos clínicos y lesiones.

En la actualidad se describen tres formas de la enfermedad: la forma aguda, denominada enteropatía hemorrágica proliferativa (PHE) o ileítis proliferativa hemorrágica, que es la forma menos frecuente; la forma crónica o adenomatosis intestinal porcina (PIA), más frecuente que la forma aguda; y la forma subclínica, que es también una forma muy común (Leite *et al.*, 2019).

La PHE fue descrita por primera vez en cerdos en 1931. Típicamente se caracteriza por infectar a cerdos mayores de 4 meses, tanto reproductores como al final del cebo, provocándoles una diarrea hemorrágica con heces alquitranadas o negruzcas, y apareciendo también anemia hemorrágica, abortos e incluso muertes súbitas esporádicas, con una mortalidad en torno al 50 % (Leite *et al.*, 2019).

En cambio, la PIA es una forma autolimitante, que afecta a cerdos jóvenes entre 2 y 20 semanas de edad, en cebo o en el final de la transición, provocando diarrea acuosa verdosa de semisólida a líquida, sin presencia de sangre a diferencia de la PHE. Este cuadro suele producir

disminución en el consumo de pienso, disminución de la ganancia media y retraso en el crecimiento dado que el intestino es menos funcional, haciendo así que los lotes de cerdos sean muy heterogéneos. Así, la PIA no es una forma que cause gran mortalidad (entre el 0-5%), pero sí provoca grandes pérdidas económicas en la producción de cerdos de cebo (Leite *et al.*, 2019).

Las formas clínicas de la enfermedad son muy importantes, pero lo que se observa más a menudo en las explotaciones porcinas es la forma subclínica. Esta forma afecta a cerdos de cebo pero sin causar diarreas en los animales, sino que lo que provoca es un peor rendimiento productivo con sus respectivas pérdidas económicas (Campillo *et al.*, 2021). La única forma de demostrar la presencia de *Lawsonia intracellularis* en un curso subclínico es a través de técnicas diagnósticas de elevada sensibilidad como la qPCR, aunque son métodos también condicionados por la excreción intermitente de la bacteria en las heces (Baldasso *et al.*, 2023).

4.6. Diagnóstico.

En cuanto al diagnóstico de la ileítis porcina, desde un punto de vista clínico es una tarea complicada ya que no existen signos patognomónicos, y además se producen numerosas infecciones subclínicas que no son fáciles de detectar haciendo necesaria una monitorización los parámetros productivos. Por otro lado, la eliminación de las bacterias es intermitente, y además existen pocas herramientas de detección validadas. A esto se une también la dificultad del diagnóstico diferencial, ya que otros patógenos como *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium, Circovirus porcino tipo 2 o *Brachyspira hyodysenteriae* tienen presentaciones clínicas muy similares (Campillo *et al.*, 2021).

Las principales técnicas diagnósticas para la detección de *Lawsonia intracellularis* en ganado porcino son (Campillo *et al.*, 2021):

- **Técnicas directas:**

- **Cultivo bacteriano:**

Lawsonia intracellularis es un bacilo intracelular obligado, por lo que el cultivo no es una buena opción de diagnóstico, ya que el crecimiento *in vitro* de esta bacteria es realmente difícil. Esta bacteria no crece en medios bacterianos convencionales y requiere de cultivos de tejidos bajo tensión de oxígeno reducida, unos requisitos de crecimiento complicados de conseguir, y no todos los laboratorios tienen puesta a punto esta técnica.

- **Tinción de Warthin-Starry (WS):**

Se trata de una tinción a base de nitrato de plata para la detección de espiroquetas, que se basa en la capacidad de estos organismos de absorber la plata. La tinción WS es una técnica rentable para confirmar la infección por *Lawsonia intracellularis*, y a menudo está disponible en cualquier laboratorio. En cambio, se trata de una técnica poco específica, ya que no se puede distinguir *Lawsonia intracellularis* de otros bacilos curvos como *Campylobacter* spp., además de presentar baja reproducibilidad y repetibilidad.

○ **PCR:**

Tanto la PCR convencional como la qPCR son técnicas rápidas y altamente sensibles y específicas para detectar el ADN de *Lawsonia intracellularis* en las muestras fecales o intestinales. Para poder detectar el patógeno en muestras de heces, hay que tener en cuenta que este se elimina desde los 7 días postinfección hasta las 10 semanas. La ventaja de los métodos moleculares es la capacidad de detectar la bacteria *antemortem* de una forma rápida y precisa en las primeras etapas de la infección. Otra de las ventajas es la posibilidad de utilizar la misma muestra para detectar otros patógenos digestivos como *B. hyodysenteriae* o *Salmonella* spp. Por otro lado, entre las principales desventajas de esta técnica podemos señalar la imposibilidad de diferenciar cepas patógenas de las cepas de la vacuna viva frente a *Lawsonia intracellularis*, y la existencia de falsos negativos debido a la excreción intermitente de la bacteria.

○ **Inmunohistoquímica (IHC) e Inmunofluorescencia Directa (IFD):**

Estas dos pruebas basadas en la detección de antígenos en tejidos infectados son de las más fiables para el diagnóstico de *Lawsonia intracellularis*, aunque solo nos sirven para el diagnóstico *postmortem*. La IFD presenta una sensibilidad del 89 % y una especificidad del 97 %, mientras la IHC con una sensibilidad del 87 % (Campillo *et al.*, 2021). El principal inconveniente de estos métodos es la necesidad de personal adecuadamente formado y el material necesario para analizar las muestras, lo que incrementa mucho los costes.

En relación con todas estas técnicas directas, cabe mencionar que un estudio reveló que la IFD, con una sensibilidad del 89 % y una especificidad del 97 % y una concordancia del 82 % con la PCR, puede llegar a ser una de las alternativas a la PCR en el diagnóstico *postmortem* de la EPP. En cambio, el examen histopatológico demostró ser poco útil como método diagnóstico principal, aunque sí pareció ser eficaz para diagnosticar la infección por *Lawsonia intracellularis* en casos con lesiones de tipo proliferativo. Finalmente, los valores obtenidos del

examen de lesiones macroscópicas y la tinción de WS demostraron no ser especialmente válidas para el diagnóstico de la infección por *Lawsonia intracellularis* (Corzo *et al.*, 2005).

- **Técnicas indirectas:**

- **Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):**

Esta prueba se emplea para detectar los anticuerpos IgG en sueros de cerdos en contacto con *Lawsonia intracellularis*. Su funcionamiento consiste en la adición de un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo, el cual se va a unir al anticuerpo primario y va a emitir fluorescencia, que puede ser detectada mediante un microscopio de fluorescencia.

- **Ensayo de monocapa de inmunoperoxidasa (IPMA):**

Esta prueba diagnóstica es muy similar a la IFI, con la diferencia de que en esta prueba se produce un cambio colorimétrico por la descomposición del sustrato por la acción de la peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario. Esta técnica tiene las ventajas de que la coloración marrón que provoca es fácilmente observable con un microscopio sin necesidad de utilizar medios más complejos y, además, esta coloración es más estable y dura más tiempo en comparación con la fluorescencia de la IFI.

Estas dos últimas técnicas, IFI e IPMA, son actualmente consideradas las más específicas para la detección de *Lawsonia intracellularis*; sin embargo, ambas requieren de células infectadas, por lo que es necesario realizar previamente el cultivo *in vitro* de la bacteria, un gran inconveniente tal como se comentó previamente (Campillo *et al.*, 2021).

- **Prueba de Anticuerpos por Citometría de Flujo (FCAT):**

La FCAT es una nueva prueba diagnóstica serológica para detectar anticuerpos de *Lawsonia intracellularis*. Esta técnica emplea como antígeno detector una cepa viva atenuada de la bacteria disponible en una vacuna comercial. Las ventajas de esta técnica son la alta sensibilidad y especificidad que presenta, 98,8 % y 100 % respectivamente, así como la rapidez y la facilidad para realizarla.

En esta prueba, los anticuerpos porcinos interactúan con la bacteria que se encuentra flotando en el pocillo de la placa. La unión de los anticuerpos específicos a la bacteria se demuestra posteriormente a través de un anti-anticuerpo conjugado con ficoeritrina que es específico para la IgG del porcino, y se termina leyendo en un citómetro de flujo (Figura 1).

Como inconveniente de la FCAT, al igual que las técnicas ELISA, IPMA e IFAT, hay que señalar la imposibilidad de diferenciar los animales vacunados de animales infectados naturalmente por la bacteria (Baldasso *et al.*, 2023).

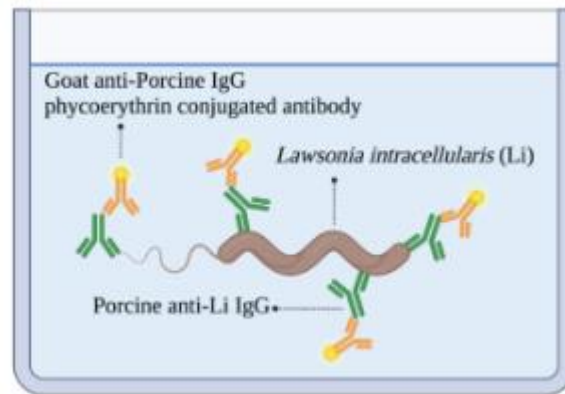


Figura 1. Ejemplo del funcionamiento de la FCAT. (Baldasso *et al.*, 2023, con licencia Creative Commons CC BY).

- **ELISA:**

Las pruebas de ELISA permiten detectar selectivamente anticuerpos frente a *Lawsonia intracellulans*, o bien antígenos de la bacteria en el caso del ELISA directo. Además, tienen la ventaja de que son fáciles de realizar a diferencia de otras como la IFD o IPMA, las cuales implican procedimientos más laboriosos y complicados, y no requieren cultivo del organismo, el cual también es difícil debido a que se trata de una bacteria intracelular con condiciones de cultivo muy estrictas tal como se ha comentado (Campillo *et al.*, 2021).

Una de las desventajas de esta prueba es la dificultad en la interpretación de los resultados, ya que se puede interpretar que los cerdos estén infectados y hayan desarrollado respuesta inmune, pero también puede ser que los cerdos hayan recibido anticuerpos pasivamente a través del calostro o los hayan desarrollado tras una vacunación frente a *Lawsonia intracellulans* (Campillo *et al.*, 2021).

Principalmente, existen tres tipos clásicos de ELISA, los cuales se diferencian básicamente en cuanto al elemento que se quiere detectar (antígeno o anticuerpo) y también en cuanto al principio empleado para la detección:

- **ELISA directo (tipo sándwich):**

En este caso se trata de una técnica directa que permite detectar antígenos de *Lawsonia intracellulans*. El principio de la prueba se basa en un anticuerpo específico de captura que se fija en el pocillo de la placa, donde a continuación

se añade la muestra que puede presentar el antígeno; en caso de que esté presente, el antígeno se unirá al anticuerpo que tapiza el pocillo. A continuación, en un segundo paso, se añade un segundo anticuerpo, en este caso de detección, el cual va marcado con una enzima, y que se unirá al antígeno en aquellas muestras que sean positivas. Por último, se añade un sustrato que será catalizado por la enzima del anticuerpo de detección en aquellas muestras en que esté presente, proporcionando por tanto color al pocillo.

○ **ELISA indirecto:**

En este caso la prueba permite detectar anticuerpos frente a *Lawsonia intracellularis*. Esta prueba, a diferencia de la anterior, se basa en tapizar los pocillos de la placa con antígeno de la bacteria. A continuación, se añade el suero problema, que en caso de presentar anticuerpos se unirán al antígeno de la placa. Posteriormente se añade un anti-anticuerpo conjugado a una enzima que se dirige contra los anticuerpos primarios que se encuentran unidos a las placas, y finalmente un sustrato para la enzima, que será catalizado en caso de que la muestra sea positiva. En este caso, al igual que el ELISA directo, los pocillos que producen color son los positivos (Figura 2).

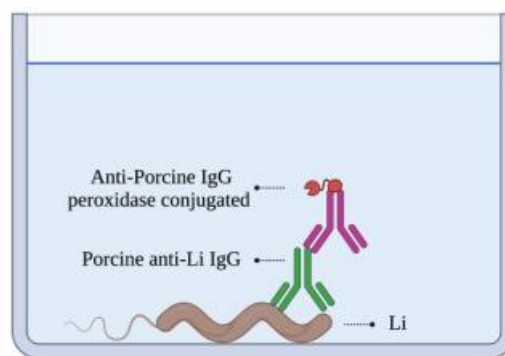


Figura 2. Ejemplo del funcionamiento del indirecto
(Baldasso *et al.*, 2023, con licencia Creative Commons CC BY).

○ **ELISA de competición:**

A diferencia del anterior, en este caso los pocillos de la placa se encuentran tapizados con un anticuerpo monoclonal frente a *Lawsonia intracellularis* que se emplea para capturar la bacteria procedente de un cultivo, usando este complejo para la detección de los posibles anticuerpos presentes en la muestra. A continuación, se añade el suero problema, de tal forma que si este presenta anticuerpos estos se unirán al antígeno de la placa. Posteriormente se añade un

anticuerpo secundario marcado con una enzima que va dirigido también contra el antígeno de *Lawsonia intracellularis*. Así, se produce una competencia entre el anticuerpo natural de la muestra y el anticuerpo conjugado por unirse con el complejo presente en los pocillos, y el proceso termina de manera similar a los otros casos con la adición de un sustrato para enzima el anticuerpo conjugado (Hayrapetyan *et al.*, 2023). Por tanto, a diferencia del ELISA indirecto, donde la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos que existen en la muestra, en el de competición es inversamente proporcional, es decir, cuanto menos color, más anticuerpos frente a *Lawsonia intracellularis* existen en la muestra problema (Figura 3).

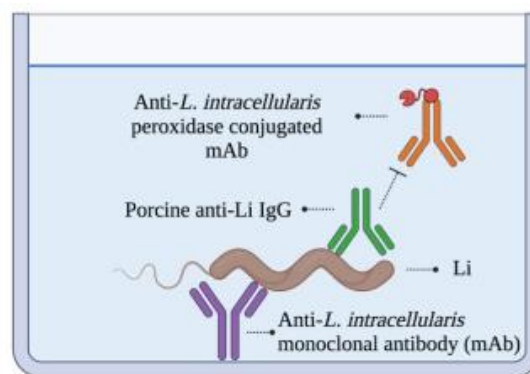


Figura 3. Ejemplo del funcionamiento del ELISA de competición (Baldasso *et al.*, 2023, con licencia Creative Commons CC BY).

4.7. Tratamiento, prevención y control.

El tratamiento de la forma aguda se basa en la antibioterapia y una terapia de soporte adecuada, unida también a medidas de control como una buena limpieza y desinfección para reducir la presión de la infección, ya que la erradicación es imposible. En cuanto a la antibioterapia, se necesitan antibióticos altamente liposolubles capaces de penetrar y llegar al lugar de la infección intracelular. Las clases más utilizadas y que presentan una buena respuesta son las pleuromutilinas, las lincosamidas, los macrólidos y las tetraciclinas (Karuppannan & Opriessnig, 2018). Estos tratamientos pueden ser administrados vía oral en el agua de bebida o pienso, o de forma parenteral en aquellos animales más afectados que ya no acuden a la comida o bebida. A la hora de aplicar un tratamiento u otro, los clínicos se deben basar en la eficacia clínica de los medicamentos o, en su defecto, en la bibliografía que existe sobre tratamientos descritos frente a esta bacteria (Figura 4); esto es debido a la inexistencia de pruebas

comerciales de susceptibilidad de la bacteria, ya que, por sus características, la realización de estas pruebas es complejo.



Figura 4. Susceptibilidad a antimicrobianos de *Lawsonia intracellularis* (verde: sensible; rojo: resistente) (Karuppannan & Opriessnig, 2018).

Por otra parte, para el manejo de la forma crónica no se utilizan tratamientos antibióticos, sino que consiste principalmente en la limpieza y desinfección periódica para poder reducir la infección al máximo, y complementarlo con la vacunación a las 3 semanas de edad de los animales.

Actualmente, el control de la EPP se realiza principalmente a través del uso de vacunas (Musse *et al.*, 2023). En el mercado se encuentran dos tipos de vacunas, una para administración en el agua de bebida y otras mediante inyección intramuscular (Salazar *et al.*, 2023). Diversos estudios han demostrado su efectividad para el control de la enfermedad y, además, es una medida que ayuda a reducir el uso de antimicrobianos en el sector de la producción porcina (Baldasso *et al.*, 2023).

Tabla 2. Resumen de las características de las vacunas. Fuente: Cimavet.

| Nombre comercial (laboratorio) | Vía de administración | Principio activo | Edad mínima de administración | Duración de la inmunidad |
|--|-----------------------|---|-------------------------------|----------------------------|
| Enterisol ileitis (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH) | Oral (2ml/cerdo) | <i>L. intracellularis</i> viva atenuada | > 3 semanas | Mínimo 17 semanas |
| Porcilis Lawsonia (Merck Sharp & Dohme Animal Health S.L.) | Intramuscular | <i>L. intracellularis</i> inactivada | > 3 semanas | 21 semanas post-vacunación |

Por último, y tal como se ha indicado, la existencia de contaminación de origen fecal en la granja es uno de los principales factores para el desarrollo de la enfermedad. Así, la principal medida higiénica para el control debe ser la aplicación de un protocolo adecuado de limpieza y

desinfección, empleando desinfectantes eficaces en las superficies de la granja. Además, debido a la posible transmisión a través de roedores, otra medida recomendada para mantener las explotaciones negativas sería realizar un control exhaustivo de estos animales mediante el uso de trampas u otros métodos autorizados (Karuppanan & Opriessnig, 2018).

5. OBJETIVOS

Tal como se ha señalado en la introducción, el diagnóstico clínico de la EPP es complejo dado la inespecificidad de los signos, así como la inexistencia de lesiones patognomónicas en el examen *postmortem*. Debido a esto, es necesario recurrir a la realización de técnicas diagnósticas para poder identificar a los animales infectados, pero dado que la eliminación de *Lawsonia intracellularis* es intermitente, el empleo de técnicas indirectas cobra especial relevancia. Por tanto, con la realización de este trabajo de fin de grado se busca alcanzar los siguientes objetivos:

- 1º. Comparar dos formatos comerciales de ELISA para detección de anticuerpos, uno de tipo competición frente a otro de tipo indirecto tradicional, para la clasificación sanitaria de animales en relación con la infección por *Lawsonia intracellularis*.
- 2º. Discutir la utilidad de ambos métodos para la monitorización serológica de la infección por *Lawsonia intracellularis* en animales de cebo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio, se pretende realizar la comparación de dos técnicas ELISA para la detección de anticuerpos frente a *Lawsonia intracellularis*. Actualmente, existen dos kits ELISA comerciales, el *Svanovir L. intracellularis / Ileitis –Ab* (Boehringer Ingelheim Svanova Uppsala, Suecia), un ELISA de tipo competición el cual detecta inmunoglobulinas totales sin diferenciación entre IgA, IgM o IgG (Campillo *et al.*, 2021) y el *AsurDX™ Lawsonia intracellularis Antibody Test* (BioStone Southlake, EEUU), un ELISA indirecto de formato tradicional, que detecta IgG contra *Lawsonia intracellularis* en suero/plasma de cerdo.

En este caso, para facilitar la lectura de este trabajo se empleará la siguiente nomenclatura:

- **Kit A:** *Svanovir L. intracellularis / Ileitis –Ab* (Boehringer Ingelheim Svanova Uppsala, Suecia).
- **Kit B:** *AsurDX™ Lawsonia intracellularis Antibody Test* (BioStone, Shothlake, EEUU).

El kit A se caracteriza por ser un ELISA competitivo de base sólida, el cual, se utiliza para detectar anticuerpos frente a *Lawsonia intracellularis* en una muestra de suero o plasma de origen porcino, gracias a la competencia generada entre los anticuerpos presentes en la muestra y los anticuerpos conjugados suministrados con el kit por la unión con un antígeno específico que se encuentra fijado en los pocillos de la placa. En el caso de que en la muestra existan anticuerpos de *Lawsonia intracellularis*, estos se unirán al antígeno fijado en el pocillo y bloquearán los lugares de unión al antígeno. Si en la muestra no existen anticuerpos frente a la bacteria, al añadir posteriormente el anticuerpo conjugado con la enzima este se va a unir a los lugares de unión al antígeno fijado que quedaron libres. En el momento en el que se añade el sustrato, se formará una coloración azul, la cual se debe a la conversión del sustrato por el conjugado y cuya intensidad será inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra de suero (a mayor intensidad de color, menos cantidad de anticuerpos frente a *Lawsonia intracellularis* en la muestra problema).

En cambio, el kit B se identifica como un ELISA indirecto tradicional, por lo que su funcionamiento es ligeramente diferente. En este caso, el comienzo de la técnica es idéntico al anterior: los pocillos de la placa están tapizados con antígeno de *Lawsonia intracellularis* a los cuales se les añade la muestra de suero a estudiar, de forma que si esta contiene anticuerpos frente a la bacteria estos se unirán al antígeno del pocillo. Sin embargo, a diferencia del ELISA de competición, en este caso se añade un anti-anticuerpo conjugado específico que se unirá al anticuerpo de la muestra. A continuación, se añade el sustrato, el cual va a producir un cambio de color en la muestra en función de la cantidad de conjugado que esté presente. De esta forma, la interpretación de los resultados es al contrario totalmente con respecto al ELISA de

competición, ya que la intensidad de la coloración en este caso es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo frente a *Lawsonia intracellularis* presente en la muestra.

6.1 Origen de los animales y toma de muestras.

Para la realización de este estudio, se utilizaron 180 sueros obtenidos de ganado porcino en régimen de producción intensiva. Estos sueros provenían de cerdos alojados en tres cebaderos diferentes, pero cuyo origen era común, es decir, la misma granja de producción de lechones. En los tres cebaderos los cerdos se alojaban en cuadras de aproximadamente 15 animales, con alimentación y agua *ad libitum*. Las muestras se obtuvieron de animales sin vacunar frente a *Lawsonia intracellularis*, y cabe señalar que en ninguno de los cebaderos se observaban cerdos con signos clínicos de EPP.

En cada cebadero se tomaron muestras en tres momentos diferentes: un primer muestreo cuando los cerdos tenían 14 semanas de vida, otro a las 16 semanas y finalmente otro a las 18 semanas de vida. En cada visita se tomaron muestras de 20 animales seleccionados de forma aleatoria, que fueron transportadas en condiciones de refrigeración hasta el laboratorio.

6.2 Análisis de laboratorio.

Una vez en el laboratorio, las muestras de sangre se mantuvieron en refrigeración en nevera hasta el día siguiente en el que se realizó el proceso de desuerado. Este procedimiento consiste en centrifugar las muestras de sangre a una velocidad de 2500 x g durante un tiempo de 10 minutos. Tras este proceso se consigue la separación de los componentes de la sangre, con la fracción celular formando un coágulo en la parte inferior y el suero en la superior. De esta forma, empleando una pipeta Pasteur se depositó una alícuota de suero en un tubo tipo Eppendorf para su posterior congelación a -80°C hasta la realización de los ELISA.

6.2.1 ELISA de competición.

Para el ensayo con el kit A, el protocolo que se empleó fue el siguiente:

- 1) Antes de iniciar el procedimiento se deben atemperar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25 °C).

- 2) En la placa de ELISA suministrada, se añaden 90 µl de la solución tampón de dilución en cada pocillo de la placa de ELISA.
- 3) A continuación se añaden 10 µl del control positivo en dos pocillos y 10 µl del control negativo en otros dos pocillos.
- 4) Posteriormente se añaden 10 µl de cada muestra de suero a estudiar en el pocillo correspondiente.
- 5) Se sella la placa, se agita y se procede a incubar a una temperatura de 37 °C durante 60 minutos.
- 6) Después de la incubación se procede a realizar tres lavados de la placa con el buffer PBS-Tween. En cada lavado se debe llenar los pocillos (aproximadamente 300 µl) y a continuación eliminar bien todos los restos del líquido de lavado.
- 7) Tras los lavados se añaden 100 µl del conjugado a concentración 1X a cada pocillo y se procede a incubar de nuevo la placa a 37 °C durante 60 minutos.
- 8) Finalizada la incubación, se procede a realizar tres nuevos lavados con el buffer PBS-Tween como en el paso 6.
- 9) Finalizados los lavados se añaden 100 µl de la solución del sustrato a cada pocillo y se incuba la placa 10 minutos a temperatura ambiente.
- 10) Tras estos 10 minutos, se añaden 50 µl de la solución de parada (Stop solution) a cada pocillo de la placa.
- 11) Una vez realizados todos los pasos, se procede a medir la densidad óptica en los 15 minutos siguientes a la adicción de la solución de parada, empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Validación del ensayo y cálculo del porcentaje de inhibición (PI):

Se debe calcular la media de la densidad óptica de los controles empleados. Además, se debe calcular el porcentaje de inhibición (PI) para el control positivo y las muestras utilizando la siguiente fórmula:

$$PI = \frac{DO \text{ control negativo} - DO \text{ muestra o control positivo}}{DO \text{ control negativo}} \times 100$$

Para que el ensayo sea válido, la densidad óptica del control negativo debe ser igual o mayor a 0,5 y el porcentaje de inhibición del control positivo debe ser superior al 40 %.

Para la interpretación de resultados, la muestra se considera positiva si el porcentaje de inhibición es igual o superior al 30 %, mientras que si el porcentaje de inhibición es menor a 30 %, la muestra se considera negativa.

6.2.2 ELISA indirecto:

El protocolo empleado con el kit B fue el siguiente:

- 1) Antes de iniciar el procedimiento deben atemperarse tanto los reactivos suministrados como las muestras a analizar, para a continuación diluir 25 μ l cada suero en 100 μ l de diluyente del suero (dilución 1:5).
- 2) En una placa antigenada de ELISA, se añaden los controles positivos y negativos en los cuatro primeros pocillos de la placa (dos positivos y dos negativos) empleando un volumen de 100 μ l de cada uno en cada pocillo.
- 3) A continuación, se dispensan 90 μ l del diluyente de ensayo a cada pocillo de la placa antigenada. Una vez añadido este, se añaden 10 μ l de las muestras previamente diluidas tal como se explica en el paso 1.
- 4) Después de añadir el suero, la placa antigenada de ELISA se cubre con film adhesivo, se agita y se incuba a una temperatura de 40°C durante 30 minutos.
- 5) Terminada la incubación, se descarta el contenido de los pocillos y se procede a realizar cinco lavados, añadiendo 250 μ l de la solución de lavado 1X a cada pocillo y descartando a continuación el contenido para cada uno de estos lavados.
- 6) Tras realizar los lavados, se añade en cada pocillo 100 μ l de la solución de anticuerpo conjugado, incubando de nuevo la placa durante 30 minutos a 40 °C.
- 7) Finalizada la segunda incubación, se descarta de nuevo el contenido de los pocillos y se procede a realizar cinco lavados al igual que en el paso 5.
- 8) Una vez terminado el segundo proceso de lavado se añaden 100 μ l del sustrato, el cual va a permitir la reacción colorimétrica, y se procede a incubar la placa de ELISA a una temperatura de 40°C durante 15 minutos.
- 9) Para finalizar el procedimiento y detener la reacción colorimétrica, se añaden 100 μ l de la solución de parado.
- 10) Una vez detenida la reacción, se debe proceder a la lectura de la placa de ELISA en un periodo de tiempo no superior a 10 minutos empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Validación del ensayo y cálculo del porcentaje de positividad (PP):

En primer lugar, se debe calcular la media de la densidad óptica de los controles positivos y negativos. Para que el ensayo sea válido, la media de la densidad óptica del control negativo debe ser inferior a 0,3, mientras que la media de la densidad óptica del control positivo debe ser superior o igual a 0,5.

A continuación, se debe calcular el porcentaje de positividad (PP) de todas las muestras en estudio. Para ello se emplea la siguiente fórmula:

$$PP = \frac{DO \text{ muestra} - \text{Media de DO control negativo}}{\text{Media de DO control positivo} - \text{Media de DO control negativo}} \times 100$$

Para este ensayo, el resultado se considera positivo en el caso de que el PP sea mayor o igual al 30 %, mientras que el resultado sería negativo si el porcentaje de positividad es menor a 30 %.

6.3 Análisis estadístico:

Una vez realizada la lectura de las placas antigenadas de cada ELISA en el espectrofotómetro, se obtuvieron una serie de resultados que fueron utilizados para calcular la proporción de animales seropositivos y seronegativos de todo el estudio, así como de cada granja y cada visita para ambos kits de ELISA utilizados. Estos datos se procesaron con la ayuda de la hoja de cálculo Microsoft Excel, y a continuación se analizaron estadísticamente utilizando el programa R Studio versión 2023.12.1 + 402 (Viena, Austria).

Para comenzar el análisis estadístico se construyó una tabla de contingencia con los valores positivos y negativos obtenidos con cada kit para poder valorar el acuerdo entre ambos. A continuación, se realizó la prueba de correlación de McNemar, un análisis que nos permite contrastar si ambos kits detectan la misma proporción de seropositivos utilizando muestras pareadas. Por último, se calculó el nivel de concordancia entre ambos ELISA utilizando el índice *Kappa* (K), una prueba estadística que mide la robustez de la concordancia entre dos pruebas diagnósticas, y nos indica por tanto la calidad de la asociación entre estos dos ELISA. Para calcular este índice *Kappa*, fue necesario emplear el paquete “epiDisplay” en el programa RStudio (Chongsuvivatwong, 2022). Los resultados obtenidos se interpretaron siguiendo la escala descrita por Landis y Koch (1977) (Tabla 3).

Tabla 3. Valoración del índice *Kappa* (Landis & Koch, 1977).

| VALOR DE K | FUERZA DE LA CONCORDANCIA |
|-------------|---------------------------|
| < 0,20 | Pobre |
| 0,21 – 0,40 | Débil |
| 0,4 – 0,60 | Moderada |
| 0,61 – 0,80 | Buena |
| 0,81 – 1,00 | Muy buena |

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Comparación entre kits de ELISA.

De los 180 sueros analizados con el kit A, 131 (72,7%) mostraron un resultado positivo a este ELISA competitivo; en cambio, los resultados obtenidos con el kit B indicaron que solamente 52 sueros (28,9 %) mostraban un resultado positivo a este ELISA indirecto. Por tanto, tal como se ilustra en la figura 4, existe una importante diferencia en cuanto a los resultados obtenidos dependiendo del ELISA empleado.

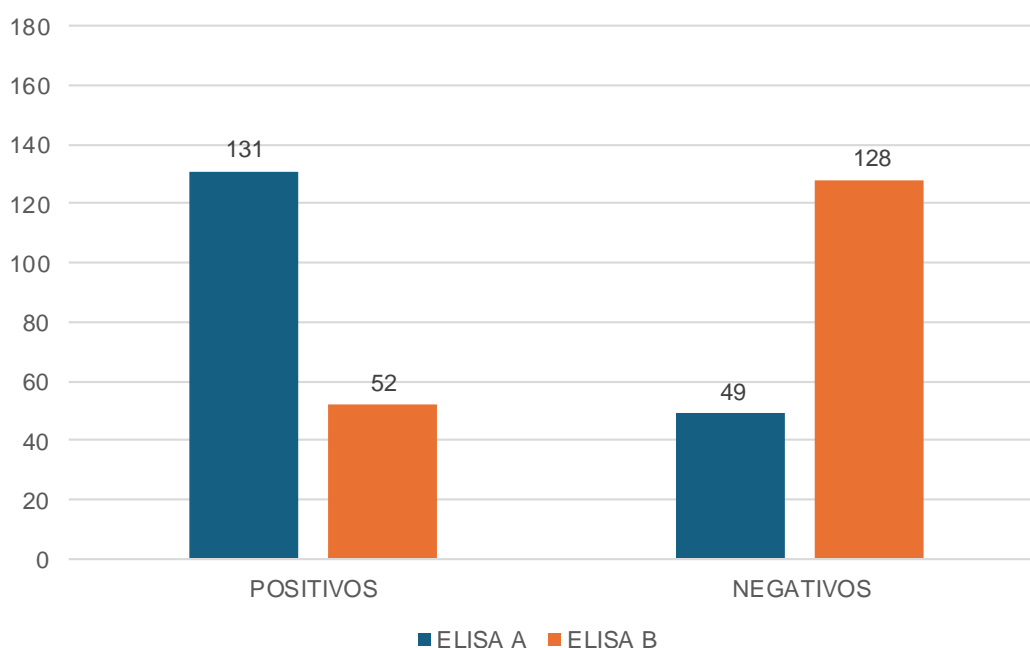


Figura 5. Número de sueros positivos y negativos con cada kit ELISA

La tabla de contingencia con los datos obtenidos con cada kit de ELISA construida previamente al análisis puede observarse en la Tabla 4. De manera general, puede decirse que los resultados de las pruebas estadísticas realizadas reforzaron las diferencias observadas. Así, la prueba de McNemar no mostró una gran coincidencia entre ambos kits, obteniendo un p -valor $< 0,0001$ ($\chi^2=61,455$) lo que indica que existen diferencias significativas en cuanto a la detección de animales seropositivos con cada ELISA. En cuanto a la concordancia entre las dos pruebas, el índice *Kappa* obtenido fue de 0,077, de modo que, de acuerdo a la Tabla 3, se concluye que la concordancia de los dos kits estudiados ha sido “pobre” (Landis & Koch, 1977). Además, este análisis estadístico también dio como resultado que el acuerdo observado entre ambos kits en la

prueba de concordancia fue solamente del 45 %, lo que nos indica la proporción de casos en los que ambos ELISAs estuvieron de acuerdo.

Tabla 4. Tabla de contingencia con los resultados obtenidos de cada kit ELISA.

| Kit B | Kit A | | |
|-----------|-----------|-----------|-----|
| | NEGATIVOS | POSITIVOS | |
| NEGATIVOS | 39 | 89 | 128 |
| POSITIVOS | 10 | 42 | 52 |
| | 49 | 131 | |

Los resultados obtenidos en la prueba de McNemar y el valor *Kappa* en este estudio reflejan por tanto un bajo nivel de concordancia y acuerdo entre ambas pruebas ELISA. En relación con esto, en la revisión de otros trabajos que comparan también técnicas de ELISA de competición frente a ELISA indirecto podemos encontrar todo tipo de resultados:

- En un estudio sobre diagnóstico de la dermatosis nodular bovina se obtuvo un valor de *Kappa* de 0,874 entre un ELISA de competición y un ELISA indirecto (Baselli *et al.*, 2025), indicando en este caso que la fuerza de concordancia entre las pruebas es “muy buena” según el estudio de Landis y Koch (1977).
- Otra investigación realizó una evaluación y comparación entre cinco pruebas ELISAs diferentes para la detección de leucemia bovina, entre los que se encontraban ELISAs indirectos y ELISAs competitivos (Kuczewski *et al.*, 2018). Los resultados mostraron unos valores *Kappa* elevados ($K = 0,91$ y $K = 1$), lo cual se corresponde con una concordancia entre estas pruebas “muy buena” (Landis & Koch, 1977).
- Otro estudio llevado a cabo en pacientes humanos comparó distintas pruebas diagnósticas para la detección de la miastenia *gravis*, entre las que se encontraban también un ELISA competitivo y un ELISA indirecto. En este caso, el índice *Kappa* que refleja la asociación entre ambos ELISAs fue igual a 0,53, lo que nos indica que la fuerza de concordancia entre ambos test fue “moderada” (Gambino *et al.*, 2023).
- En otro estudio se propuso el desarrollo de un nuevo ELISA de competición para la detección del virus de la hepatitis E aviar. Para evaluar la efectividad de este test, se propuso realizar una prueba de concordancia con las pruebas diagnósticas ya comercializadas frente a este virus, entre las que se encontraba un ELISA indirecto. Así, se obtuvo un valor de $K = 0,738$, reflejando una fuerza de concordancia “buena” entre ambos métodos (Chen *et al.*, 2022).
- Otra investigación frente al diagnóstico de *Mycoplasma bovis* en ganado vacuno, camélidos y cérvidos, realizó la comparación entre un ELISA de competición frente a dos ELISAs indirectos. La principal particularidad de este estudio fueron las diferencias

en cuanto a la correlación entre el ELISA competitivo y cada uno de los ELISAs indirectos (valores de *Kappa* entre 0,35-1 para el primero y entre 0,06-0,54 para el segundo dependiendo de la especie). Esta enorme disparidad de resultados podría explicarse en primer lugar por las diferencias entre las propias especies estudiadas, de manera que por ejemplo en ganado vacuno los valores de *Kappa* fueron de 0,62 y 0,17, mientras en llamas alcanzaron valores mucho más altos de 1 y 0,54. Otro de los motivos que podría estar implicado en estas diferencias estaría relacionado con la posible detección de anticuerpos contra más de un epítipo, de tal manera que existiese alguno que reaccione de forma cruzada con antígenos de otras bacterias y micoplasmas (Sugden *et al.*, 1997).

Tras revisar estas investigaciones se puede observar cómo los resultados de concordancia entre diferentes ELISAs varían mucho entre las diversas publicaciones, obteniendo desde asociaciones muy buenas a moderadas e incluso pobres. En general, los motivos que pueden justificar estas diferencias pueden estar relacionados con la especie en estudio, la pureza del antígeno y sobre todo al mecanismo de acción de los ELISAs (Sugden *et al.*, 1997).

En el caso concreto del presente estudio, llama la atención la poca correlación y concordancia que tienen ambos kits para la detección de *Lawsonia intracellularis* en los cerdos, de tal manera que el resultado obtenido es similar al que se podría esperar en una clasificación aleatoria. La baja concordancia entre ambos kits puede ser debida a la variabilidad en los métodos de detección de los anticuerpos tal como indican Baldasso *et al.* (2023) para esta misma especie y enfermedad, lo que puede provocar que los resultados difieran entre sí. Estos resultados tan dispares dificultan enormemente la aplicación práctica de estos ensayos a nivel de campo para la detección de seropositivos frente a *Lawsonia intracellularis*, puesto que dependiendo del ELISA empleado se obtendrán resultados diferentes lo que puede ocasionar la puesta en marcha de decisiones erróneas, por ejemplo en el contexto de un programa de control de la enfermedad. Por tanto, una de las limitaciones del presente trabajo es que sería necesario o bien comparar estos métodos ELISA contra una técnica de referencia (“*gold standard*”), o en su defecto contra una prueba que presente una mayor validez diagnóstica como por ejemplo la FCAT descrita con anterioridad, pudiendo obtener así unos valores de sensibilidad y especificidad válidos para cada kit de ELISA con referencia a la población estudiada; otra solución alternativa a este problema podría ser el empleo de un panel diagnóstico de sueros que hayan sido contrastados previamente.

7.2 Dinámica serológica frente a *Lawsonia intracellularis* con cada kit ELISA en diferentes granjas:

Para poder estudiar la dinámica que presenta la infección por *Lawsonia intracellularis* en las granjas a muestrear, se obtuvieron los porcentajes de seropositividad a la infección para cada granja y visita realizada con cada kit utilizado.

La Figura 6 nos presenta los resultados obtenidos utilizando el kit A. En este caso, se puede observar la presencia de un aumento claro de la seroconversión de los animales en dos de las tres granjas analizadas (1-3), mientras que en la segunda granja los valores detectados permanecen en niveles elevados durante todo el estudio (>70 %). En cambio, en la gráfica que nos presenta los resultados observados con el kit B (Figura 7) podemos ver que solamente una de las tres granjas a analizar (2) presentó un aumento progresivo de la positividad de los animales; las otras dos granjas mostraron una ligera oscilación de los resultados durante el estudio, pero los valores obtenidos en la semana 14 y en la semana 18 fueron iguales.

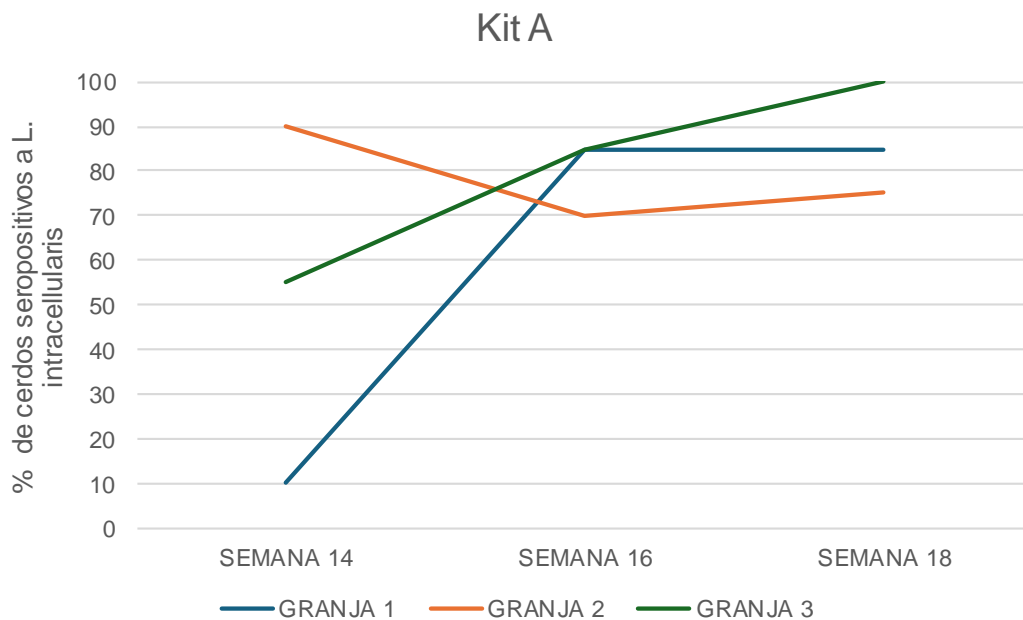


Figura 6. Porcentaje de cerdos seropositivos a *Lawsonia intracellularis* con el kit A en cada granja y en cada visita

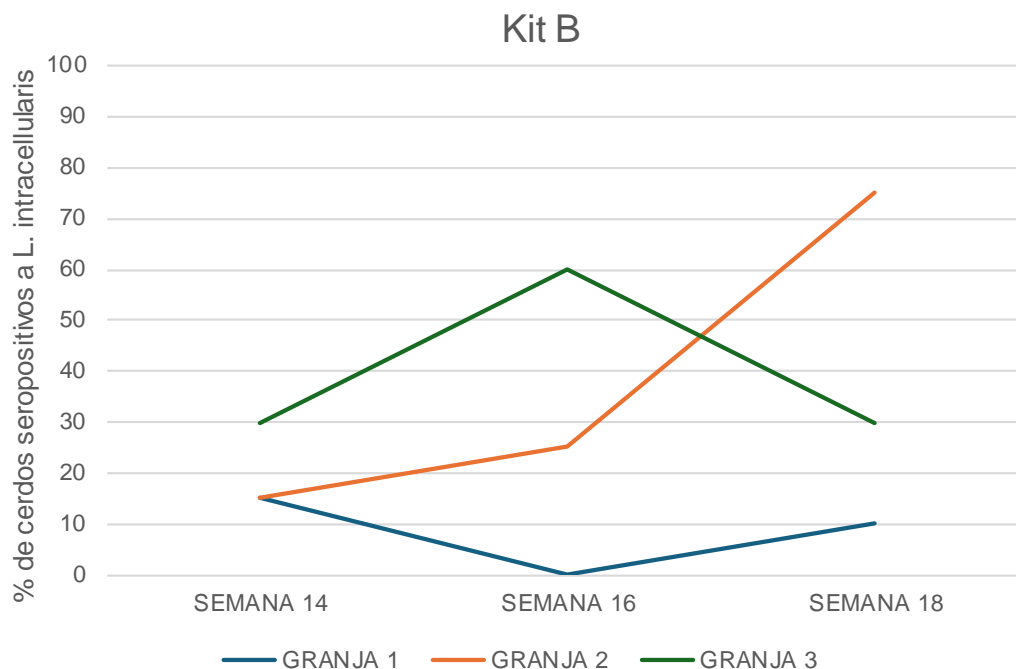


Figura 7. Porcentaje de cerdos seropositivos a *Lawsonia intracellularis* con el kit B en cada granja y en cada visita.

Los resultados obtenidos para ambos ELISAs sugieren cómo el kit A parece detectar mejor la seroconversión de los animales, ya que, con este kit, el aumento progresivo de la positividad fue detectable en dos de tres granjas, mientras que con el kit B este hecho solo se observó en una granja. Por tanto, en el caso de querer realizar un estudio longitudinal frente a *Lawsonia intracellularis*, la técnica de elección parecería ser el ELISA competitivo, ya que parece permitir una mejor detección de la seroconversión de los animales.

Por otro lado, observando el porcentaje de animales positivos a *Lawsonia intracellularis* con ambos kits de ELISA en los tres cebaderos y en las tres visitas de muestreo, se puede sospechar que la infección de los animales por esta bacteria proviene desde antes de la entrada de los animales al cebadero. Estas sospechas están fundamentadas principalmente en la presencia de animales seropositivos en el primer muestreo a las 14 semanas de vida, lo que indica que los animales ya habían seroconvertido con anterioridad a la entrada en el cebadero. Esto puede ser debido a la existencia de un nivel basal de infección endémica en la granja de origen, y por tanto que la infección de los animales se produjese en esta granja de madres, que es el origen común de los animales que se analizaron. Sin embargo, si esto ocurriese así, cabría esperar que la dinámica de la infección fuese muy similar entre las tres explotaciones, lo que no concuerda exactamente con nuestros resultados. Por otro lado, los animales en el primer muestreo que se le realizó, presentaban una edad de 14 semanas de vida. En relación con esto, Resende *et al.* (2015) indican que la susceptibilidad de los lechones a la infección comienza a las seis semanas,

mientras que en cerdos menores a cinco semanas los anticuerpos detectados suelen corresponder con anticuerpos maternos, por lo que los anticuerpos detectados en los animales analizados en este estudio no se corresponderían con anticuerpos maternos si no con los generados en respuesta a una infección natural.

Por otro lado, si el nivel de exposición en origen es el mismo para todos los animales, pero en los cebaderos la dinámica serológica es diferente tal como sucede en este trabajo, es muy posible que la diferencia se deba a condicionantes intrínsecos de cada cebadero. Uno de estos principales condicionantes puede ser una deficiente limpieza y desinfección entre lotes continuos de lechones en el cebadero, pudiendo estar el lote anterior con un elevado nivel de infección y por tanto un elevado nivel de contaminación en el medio, y que la bacteria no se pudiera eliminar en su totalidad debido a su gran resistencia ambiental, contagiando así a los siguientes lotes desde el inicio.

Una vez infectados los animales en la explotación, lo más probable que ocurra, es que estos transmitan la infección a sus compañeros y vaya aumentando el porcentaje de animales seropositivos, a medida que el tiempo avanza, como se puede ver en alguno de los cebaderos en estudio y especialmente con el ELISA de competición. Esta transmisión es normalmente debida a múltiples factores de riesgo como el encontrarse en un alojamiento colectivo con 15 cerdos más; el empleo de las mismas instalaciones para positivos y negativos; la realización de un protocolo inadecuado de limpieza y desinfección de las superficies en contacto con las deyecciones de los animales infectados; o la presencia de roedores que transmitan la infección a través de sus heces desde los animales positivos hacia los negativos.

De manera similar a lo observado en la comparación estadística realizada entre ambos ELISAs, en las figuras 6 y 7 se puede también observar cómo difieren los resultados obtenidos para cada granja y cada visita de muestreo. Por ejemplo, se puede observar como la dinámica de la infección obtenida utilizando el kit B en la granja 1 refleja un descenso de la prevalencia en la segunda visita a la semana 16 de vida, para luego aumentar y volver a los niveles iniciales en el último muestreo. Algo similar sucede también con la granja 3 con el kit B entre las semanas 16 y 18 de vida, y con la granja 2 para el kit A entre las semanas 12 y 14. La epidemiología de esta enfermedad nos indica que la seropositividad durante un brote se mantiene o aumenta, pero en ningún caso que debiera bajar. Esto puede explicarse debido a que si las muestras tomadas son de un número reducido de animales, la precisión del muestreo no es la idónea, y por tanto pueden aparecer así los resultados discordantes que se obtuvieron en este estudio. Hay que decir que para este estudio no se realizó un muestreo representativo de cada granja debido a condicionantes económicos, y por tanto la información que nos aportan los resultados obtenidos son limitados y pueden no reflejar completamente cómo se comporta la respuesta serológica a la

infección en la población. Esta cuestión es también una de las limitaciones presentadas por este trabajo, ya que para poder valorar de manera precisa este comportamiento el número de muestras tomadas para analizar (n) es posiblemente insuficiente. No obstante, esta limitación no entra en conflicto con lo observado en el análisis estadístico del acuerdo entre ambos ELISAs, que representaría también un importante inconveniente para el estudio de la dinámica serológica de la infección

8. CONCLUSIONES:

Tras la exposición de los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Grado y la discusión realizada al respecto, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1°. La comparación realizada entre el ELISA de competición y el ELISA indirecto estudiados para la clasificación sanitaria de animales con respecto a la seropositividad frente a *Lawsonia intracellularis* revelan que el acuerdo observado entre ambas técnicas es muy deficiente.
- 2°. La falta de contraste de las pruebas ELISA estudiadas con una técnica de referencia imposibilita saber de una manera precisa y objetiva cuál de estas técnicas presenta una mayor validez diagnóstica para el estudio serológico de animales con respecto a esta infección.
- 3°. Los resultados de la monitorización serológica de la infección por *Lawsonia intracellularis* en tres cebaderos con animales de un mismo origen sugiere que posiblemente el ELISA de competición pueda ser más útil para este objetivo en comparación con el ELISA indirecto, si bien sería necesario corroborar esta hipótesis mediante la realización de un muestreo representativo que aumente la precisión de los resultados.

9. BIBLIOGRAFÍA:

- Arnold, M., Crienen, A., Swam, H., Berg, S. v., Jolie, R., & Nathues, H. (2021). Correlation of *Lawsonia intracellularis* positivity in quantitative PCR and herd factors in european pig herds. *Porcine Health Management*, 7, 13. doi:10.1186/s40813-021-00192-4
- Arnold, M., Crienen, A., Swam, H., von Berg, S., Jolie, R., & Nathues, H. (2019). Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in pig herds in different european countries. *Porcine Health Management*, 5, 31. doi:10.1186/s40813-019-0137-6
- Baldasso, D. Z., Guizzo, J. A., Dazzi, C. C., Paraboni Frandoloso, G. C., Feronato, C., von Berg, S., Carvalho G., Roberto M., Wilson, H. L., Kreutz, L. C., Frandoloso, R. (2023). Development and validation of a flow cytometry antibody test for *Lawsonia intracellularis*. *Frontiers in Immunology*, 14, 1145072. doi:10.3389/fimmu.2023.1145072
- Baselli, S., Hoffmann, B., Milovanović, M., Shtjefni, V., Ricchi, M., Sabino, M., Grazioli, S., Brocchi, E., Pezzoni, G. (2025). Enhancing lumpy skin disease control: Effective competitive and indirect ELISAs for serological surveillance. *Journal of Virological Methods*, 333, 115108. doi:10.1016/j.jviromet.2025.115108
- Campillo, M., Smith, S. H., Gally, D. L., & Opriessnig, T. (2021). Review of methods for the detection of *Lawsonia intracellularis* infection in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 33(4), 621–631. doi:10.1177/10406387211003551
- Cezar, G., Leite, F. L., Fano, E., Phillips, R., Waddell, J., Dion, K., Magalhães, E., Trevisan, G., Silva, G., Linhares, D. C. (2024). Assessing the detection and interaction of *Lawsonia intracellularis* and porcine circovirus 2 in low and high-performance wean-to-finish pig groups in different porcine reproductive and respiratory syndrome virus detection scenarios. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1535803. doi:10.3389/fvets.2024.1535803
- Chen, T., Liu, B., Chen, Y., Wang, X., Zhang, M., Dang, X., Zhao, Q., Zhou, E. (2022). Development of a novel competitive ELISA based on nanobody-horseradish peroxidase fusion protein for rapid detection of antibodies against avian hepatitis E virus. *Poultry Science*, 102(1), 102326. doi:10.1016/j.psj.2022.102326

- Chongsuvivatwong, V. (2022) epiDisplay: epidemiological data display package. The Comprehensive R Archive Network. 2022. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=epiDisplay>
- Cimavet: Centro de información de medicamentos para veterinaria. Disponible en: <https://cimavet.aemps.es/cimavet/publico/home.html>
- Collins, A. M. (2013). Advances in ileitis control, diagnosis, epidemiology and the economic impacts of disease in commercial pig herds. *Agriculture*, 3(3), 536–555. doi:10.3390/agriculture3030536
- Corzo, C. A., Friendship, R., Dewey, C., & Blackwell, T. (2005). Comparison of 2 serologic tests for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *The Canadian Veterinary Journal*, 46(5), 433–435. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1090449/>
- De Raadt, A., Warrens, M. J., Bosker, R. J., & Kiers, H. A. L. (2019). *Kappa* coefficients for missing data. *Educational and Psychological Measurement*, 79(3), 558–576. doi:10.1177/0013164418823249
- de Ullibarri Galparsoro, L., & Pita Fernández, S. (1999). Medidas de concordancia: El índice de *Kappa*. *Cad Aten Primaria*, 6, 169–171.
- França, S. d. A., & Guedes, R. M. C. (2008). Antimicrobianos para o controle da enteropatia proliferativa suína. *Ciência Rural*, 38, 288–296. doi:<https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000100050>
- Gambino, C. M., Agnello, L., Ciaccio, A. M., Scazzone, C., Vidali, M., Di Stefano, V., Milano, S., Brighina, F., Candore, G., Lo Sasso, B., Ciaccio, M. (2023). Detection of antibodies against the acetylcholine receptor in patients with myasthenia gravis: A comparison of two enzyme immunoassays and a fixed cell-based assay. *Journal of Clinical Medicine*, 12(14), 4781. doi:10.3390/jcm12144781
- Garrido Haro, A. D., Barrionuevo Samaniego, M. Y., Moreno-Caballeros, P., Burbano-Enríquez, A., Salas Torres, V. A., Galante Mulki, M. C., Wielick, C., Ron-Román, J., Saegerman, C. (2025). Bayesian estimation of the true bovine brucellosis prevalence in vaccinated and non-vaccinated ecuadorian cattle populations, and the sensitivity and specificity of a competitive and indirect ELISA using a new synthetic antigen. *Microorganisms*, 13(1), 69. doi:10.3390/microorganisms13010069
- Guedes R.M.C. (2019) Epidemiología de la ileítis. Disponible en: lawsonia.net/es/offload-downloads/epidemiologia/

- Hardge T., Keller C., Seinheuer C., Tessier P.H., Salleras J.M., Rubio P., Vestergaard K., Cluydts G., Ceccarelli V., Bugliesi M., Schippers R., Johnson K., Henderson A., Papatsas I., Eichin E., Trela T., Bulay A., Maala C.. The prevalence of *Lawsonia intracellularis* infection in Europe. 2005. Proc. of the 2nd Congress of the Asian Pig Veterinary Soc. Disponible en: <https://www.3tres3.com/latam/print/10185>
- Hayrapetyan, H., Tran, T., Tellez-Corrales, E., & Madiraju, C. (2023). Enzyme-linked immunosorbent assay: Types and applications. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2612, 1–17. doi:10.1007/978-1-0716-2903-1_1
- Huerta, B., Arenas, A., Carrasco, L., Maldonado, A., Tarradas, C., Carbonero, A., & Perea, A. (2003). Comparison of diagnostic techniques for porcine proliferative enteropathy (*Lawsonia intracellularis* infection). *Journal of Comparative Pathology*, 129(2), 179–185. doi:10.1016/S0021-9975(03)00030-6
- Jacobson, M., Fellström, C., & Jensen-Waern, M. (2010). Porcine proliferative enteropathy: An important disease with questions remaining to be solved. *Veterinary Journal* (London, England: 1997), 184(3), 264–268. doi:10.1016/j.tvjl.2009.05.010
- Jacobson, M., Wallgren, P., Nordengrahn, A., Merza, M., & Emanuelson, U. (2011). Evaluation of a blocking ELISA for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis* in pig sera. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 23. doi:10.1186/1751-0147-53-23
- Karuppanan, A. K., & Opriessnig, T. (2018). *Lawsonia intracellularis*: Revisiting the disease ecology and control of this fastidious pathogen in pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 181. doi:10.3389/fvets.2018.00181
- Kuczewski, A., Orsel, K., Barkema, H. W., Kelton, D. F., Hutchins, W. A., & Meer, Frank J. U. M. van der. (2018). Short communication: Evaluation of 5 different ELISA for the detection of bovine leukemia virus antibodies. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 2433–2437. doi:10.3168/jds.2017-13626
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159–174. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/843571/>
- Leite, F. L., Abrahante, J. E., Vasquez, E., Vannucci, F., Gebhart, C. J., Winkelman, N., Mueller, A., Torrison, J., Rambo, Z., Isaacson, R. E. (2019). A cell proliferation and inflammatory signature is induced by *Lawsonia intracellularis* infection in swine. *mBio*, 10(1), 1605. doi:10.1128/mBio.01605-18

- Musse, S. L., Nielsen, G. B., Stege, H., Weber, N. R., & Houe, H. (2023). Effect of intramuscular vaccination against *Lawsonia intracellularis* on production parameters, diarrhea occurrence, antimicrobial treatment, bacterial shedding, and lean meat percentage in two Danish naturally infected finisher pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 212, 105837. doi:10.1016/j.prevetmed.2023.105837
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, Viena, Austria. Disponible en: <http://www.R-project.org/>
- Resende, T. P., Pereira, C. E. R., Gabardo, M. d. P., Haddad, J. P. A., Lobato, Z. I. P., & Guedes, R. M. C. (2015). Serological profile, seroprevalence and risk factors related to *Lawsonia intracellularis* infection in swine herds from Minas Gerais State, Brazil. *BMC Veterinary Research*, 11, 306. doi:10.1186/s12917-015-0618-z
- Rodríguez-Vega, V., Puente, H., Carvajal, A., Pérez-Pérez, L., Gómez-Martínez, S., Leite, F. L., García, R., Abella, L., Argüello, H. (2024). Detection and quantification by molecular techniques of early infection by *Lawsonia intracellularis* in suckling piglets. *Porcine Health Management*, 10, 38. doi:10.1186/s40813-024-00394-6
- Salazar, S., Starck, M. F., Villegas, M. F., Acosta, J., Sánchez, O., Ramos, E., Nova-Lamperti, E., Toledo, J.R, Gädicke, P., Ruiz, A.,; González, A., Montesino, R. (2023). New formulation of a subunit vaccine candidate against *Lawsonia intracellularis* increases humoral and cellular immune responses. *Vaccines*, 11(12), 1817. doi:10.3390/vaccines11121817
- Sugden, E. A., Stilwell, K., Rohonczy, E. B., & Martineau, P. (1997). Competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycobacterium bovis* infections based on MPB70 and lipoarabinomannan antigens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 61(1), 8–14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1189362/>
- Vannucci, F. A., & Gebhart, C. J. (2014). Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. *Veterinary Pathology*, 51(2), 465–477. doi:10.1177/0300985813520249
- Vannuci F., Gebhart C.J., McOrist S. (2019). Proliferative enteropathy. *Diseases of swine* 898-911
- Visscher, C., Mischok, J., Sander, S., Schmicke, M., Peitzmeier, E., von dem Busche, I., Rohn K, Kamphues, J. (2018). Nutrient digestibility, organ morphometry and performance in vaccinated or non-vaccinated *Lawsonia intracellularis* infected piglets. *BMC Veterinary Research*, 14, 323. doi:10.1186/s12917-018-1662-2

Westfall, P. H., Troendle, J. F., & Pennello, G. (2010). Multiple McNemar tests. *Biometrics*, 66(4), 1185–1191. doi:10.1111/j.1541-0420.2010.01408.x