



Universidad
Zaragoza

Trabajo de Fin de Grado en Veterinaria

Estudio de prevalencia de *Bacteroides fragilis* en heces de corderos de una a tres semanas, con y sin diarrea.

Field study: Prevalence of *Bacteroides fragilis* in feces of one to three weeks old lambs.

Autora

Teresa Bardají Mur

Director

Juan José Ramos Antón

Facultad de Veterinaria

2020

Índice

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 3 |
| ABSTRACT | 3 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 2.1 IMPORTANCIA DE LAS DIARREAS EN CORDEROS | 5 |
| 2.2 FACTORES PREDISPONENTES..... | 5 |
| 2.3 FACTORES DETERMINANTES | 7 |
| 2.4. BACTEROIDES FRAGILIS | 9 |
| 2.5 BACTEROIDES FRAGILIS, PATÓGENO EMERGENTE EN ESPECIES VETERINARIAS | 12 |
| 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS..... | 13 |
| 4. METODOLOGÍA..... | 14 |
| 4.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 14 |
| 4.2 ESTUDIO DE CAMPO | 14 |
| 4.3 ESTUDIO DE LABORATORIO | 16 |
| 4.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS..... | 17 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 18 |
| 6. CONCLUSIONES | 23 |
| CONCLUSIONS: | 23 |
| 7. VALORACIÓN PERSONAL | 25 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA..... | 27 |

1. RESUMEN

La diarrea es una importante patología en el ganado ovino, provocada por diversas etiologías, que suelen producir infecciones mixtas. Algunos de los patógenos implicados han sido muy estudiados y suelen ser comensales del intestino. La enfermedad únicamente se desarrollará si existen factores predisponentes que faciliten la multiplicación de los agentes etiológicos y el desequilibrio de estos y, como consecuencia, el desencadenamiento de la enfermedad. Existe una bacteria anaerobia y muy resistente, *Bacteroides fragilis*, que se comporta como patógeno digestivo para algunas especies domésticas.

Se visitaron 40 explotaciones ovinas y, en cada una de ellas, se tomaron muestras rectales mediante un hisopo a cinco corderos aparentemente sanos. Posteriormente, se hizo un pool por explotación con el cual se realizaron distintas PCR para los principales patógenos del panel clásico de diarreas. Por otra parte, se recopilaron datos analizados por el laboratorio EXOPOL S.L. procedentes de corderos con diarrea con el fin de comparar estos resultados con los de aquellos que no presentaban sintomatología, además de evaluar la prevalencia de *B. fragilis* y valorar la conveniencia de incluir esta bacteria en un diagnóstico diferencial.

A partir del análisis de los datos obtenidos se pudo concluir que no existen evidencias de que *B. fragilis* se comporte como patógeno primario en el desarrollo de un síndrome diarreico en los corderos estudiados. Sin embargo, podría considerarse una bacteria comensal del digestivo dado que aparece tanto en corderos sanos como enfermos, y es posible que, ante una disbiosis, participe en el desarrollo de la enfermedad, dado que los resultados reafirmaron el carácter multifactorial de las diarreas en corderos. Sin embargo, no se pudo establecer una relación estadísticamente significativa entre la presencia de *Bacteroides fragilis* y el desarrollo de diarreas.

ABSTRACT

Diarrhea is an important disease in sheep, caused by various etiologies, which usually cause mixed infections. Some of the pathogens involved have been extensively studied and are usually intestinal commensals. The disease will only develop if there are predisposing factors that facilitate the multiplication of etiological agents and their imbalance and, as a consequence, the

triggering of the disease. There is an anaerobic and very resistant bacterium, *Bacteroides fragilis*, which behaves as a digestive pathogen for some domestic species.

40 sheep farms were visited and, in each of them, rectal samples were taken by means of a swab from five apparently healthy lambs. Subsequently, a pool was made per farm with which different PCRs were performed for the main pathogens of the classic diarrhea panel. On the other hand, data analyzed by the EXOPOL laboratory were collected from lambs with diarrhea in order to compare these results with those of those that did not present symptoms, in addition to evaluating the prevalence of *B. fragilis* and assessing the convenience of including this bacterium in a differential diagnosis.

From the analysis of the data obtained, it could be concluded that there is no evidence that *B. fragilis* behaves as a primary pathogen in the development of a diarrheal syndrome in the lambs studied. However, it could be considered a digestive commensal bacterium since it appears in both healthy and sick lambs, and it is possible that, in the event of dysbiosis, it participates in the development of the disease, since the results reaffirmed the multifactorial nature of diarrhea in lambs. However, a statistically significant relationship could not be established between the presence of *Bacteroides fragilis* and the development of diarrhea.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Importancia de las diarreas en corderos

Las diarreas son la patología más importante de los corderos, con sus distintas etiologías alcanzan la tercera parte de las bajas en los corderos jóvenes. Ante un brote pueden llegar a morir el 100% de los corderos (Ferrer et al., 2004).

Esto supone un gran coste económico para las explotaciones ovinas. Se calcula que representa entre el 10 y el 50% de las pérdidas económicas por mortalidad neonatal, dependiendo de la gravedad del brote (Sainz y Ferrer, 2013). Además, hay que añadir otras pérdidas directas como el retraso en el crecimiento de los corderos, que supone un aumento de la edad del sacrificio, y menor beneficio final. Por otro lado, y no menos importantes, son las pérdidas indirectas, entre las que destacan los gastos veterinarios, exigencia de un manejo más laborioso, teniendo que aumentar la mano de obra y la predisposición al desarrollo de otras patologías (Espinosa, 2004).

Las diarreas del cordero son un problema multifactorial en el que participan factores predisponentes y/o favorecedores entre los que destacan aquellos relacionados con el manejo (ambiente, alimentación...) y factores determinantes: virus, bacterias y parásitos. Solo cuando convergen estos factores aparece la patología. Por eso, para abordar con éxito un problema de diarreas es imprescindible la prevención (Ferrer et al., 2007).

2.2 Factores predisponentes

Para reducir la incidencia de diarreas es importante conocer cuáles son los factores predisponentes que se enuncian a continuación:

Fallos en el programa sanitario de la madre. Una vacuna no inoculada en el momento adecuado impedirá la transmisión de anticuerpos a los recién nacidos. Los manejos innecesarios durante la gestación avanzada tendrán como consecuencia corderos débiles o abortos.

Los errores en la alimentación de las madres. En caso de sobrealimentación tras el parto van a producir leche en exceso y puede provocar indigestiones en los corderos, lo que conlleva la aparición de diarreas por el aumento de la velocidad de paso por el intestino, que disminuye la absorción de nutrientes. Por otro lado, elevadas concentraciones de lactosa en el intestino, así

como los cambios bruscos de alimentación estimulan la expulsión de agua. Si por el contrario, están subalimentadas durante la gestación, principalmente en el último periodo, se puede dar el nacimiento de corderos débiles, que tardan en levantarse y alcanzar la ubre y por lo tanto, susceptibles a la aparición de diarreas (Lacasta et al., 2013).

Esto suele ocurrir cuando no se estructura la parición en lotes, dado que no se puede ajustar ni en cantidad ni en calidad las raciones al estado reproductivo de las hembras (Ferrer et al., 2007). Por lo tanto, se producen desajustes en la relación producción de leche y necesidades del recién nacido, provocándose así, desequilibrios intestinales en los corderos por malabsorción en la luz intestinal, produciendo cambios en la flora bacteriana que provocaran la fermentación de carbohidratos y putrefacción de las proteínas cuyos productos aumentan el pH, lo que favorece el crecimiento de agentes infecciosos (Lacasta et al., 2013).

La falta de agua o la mala calidad de la misma influirá en la producción de leche, tanto en la calidad como en la cantidad. Las deficiencias en el encalostrado serán determinantes para la viabilidad del cordero, pues la calidad y cantidad del calostro determinan el nivel de inmunoglobulinas y vitaminas necesarias para la resistencia antimicrobiana e influyen en la expulsión del meconio, siendo las 24 primeras horas de vida cruciales. Se debe asegurar que la primera toma de calostro sea en las tres primeras horas de vida del cordero (Lacasta et al., 2013).

La exposición a una climatología adversa dificultará la buena salud del cordero. Temperaturas por debajo de 13°C complicarán la digestibilidad de los alimentos y aumentarán el riesgo de acidosis, temperaturas altas llevaran a la apatía del cordero, disminuyendo la ingesta de comida y el movimiento. Además, la humedad no solo en la nave sino también en los almacenes o en los comederos producirá un ambiente idóneo para la multiplicación bacteriana (Ferrer, et al., 2007).

La lactancia artificial con sustitutivos lácteos de baja calidad provoca elevadas bajas en las explotaciones, es importante tener en cuenta el intervalo entre tomas, así como las dosis y el mantenimiento de las amamantadoras, si se utilizan.

Las camas sucias o escasas favorecerán las diarreas de etiología infecciosa. Los alojamientos con orientación adecuada y parques bien diseñados mejoran la calidad de las camas. Por otro lado, el hacinamiento genera camas sucias, aumenta la concentración de gases nocivos y la

transmisión de enfermedades (Ferrer et al., 2007). La falta de limpieza y desinfección facilitará la dispersión de la enfermedad.

La mano de obra escasa o poco cualificada es un problema frecuente en las explotaciones de ovino, siendo ésta determinante para el control de los factores nombrados anteriormente (Espinosa, 2004).

2.3 Factores determinantes

Los factores determinantes son los causantes finales del cuadro diarreico. Destacan los siguientes:

- **Rotavirus:** se trata de un virus de elevada prevalencia en todo el mundo. Posee gran resistencia en el medio ambiente y su transmisión es feco-oral. Suele aparecer en corderos de hasta 10 días de vida y su periodo de incubación es de 15 horas a 5 días (Ferrer et al., 2004). Este agente es capaz de destruir los enterocitos produciendo en muchas ocasiones un síndrome de malabsorción, aunque causa desde procesos asintomáticos hasta fulminantes, que terminan con la vida del animal. Sin embargo, destaca la producción de heces diarreicas blanquecinas o, en casos muy graves, hemorrágicas. El único tratamiento posible es el sintomático, controlando los signos y las posibles complicaciones bacterianas (Chatzopoulos et al., 2013).
- ***Cryptosporidium parvum*:** Estos parásitos se caracterizan por su rápida reproducción y gran resistencia ambiental. Las diarreas en corderos aparecen desde 3 días a 4 semanas de edad, siendo más frecuentes en animales menores de 15 días. Su periodo de prevalencia oscila entre los 2 y 7 días. *Cryptosporidium parvum* es el agente más frecuente en brotes de diarreas en corderos, pero también afecta a otras especies domésticas y se considera zoonosis. Posee gran morbilidad y su mortalidad aumenta en combinación con otros agentes como *E.coli* o *Clostridium* (Ferrer et al., 2004). Las ovejas adultas suelen comportarse como portadoras asintomáticas, por lo que es preciso en este caso aplicar medidas de higiene específicas para el control del parásito (de Oliveira et al., 2016).
- ***Clostridium perfringens* (*Cl. perfringens*):** Bacteria Gram positiva y anaerobia, de interés tanto en sanidad animal como humana. Destaca por ser la bacteria patógena más extendida en la naturaleza y por su alta capacidad para producir distintas toxinas y enzimas. Estas son las

responsables de los síntomas y las lesiones y, su producción se utiliza para la clasificación de los 5 tipos de esta bacteria (Rasool et al., 2017). *Cl. perfringens* A y C afectan principalmente a los corderos de 1 a 3 semanas, el tipo B es más frecuente en la segunda semana de vida (disentería de los corderos, diarrea blanca) y el tipo D más tarde, pero puede aparecer previamente ante un mal encalostro. El tratamiento vuelve a ser complicado, y a la hora de buscar una vacuna debe hacerse pensando en las características de las toxinas, puesto que son estas las que causan la patología, siendo algunas muy inmunógenas, lo cual las hace buenas candidatas para las vacunas (Ferrer et al., 2004).

- ***Escherichia coli (E. coli)***: Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y móvil mediante flagelos. Es un agente ambiental que puede sobrevivir durante varios meses en las heces y es habitual del tracto digestivo de todos los mamíferos, aunque más común en los carnívoros (Gökçe et al., 2010). La sensibilidad es muy elevada hasta el tercer día de vida, pero una gran proliferación puede provocar mortalidades del 100% durante los primeros 15 días de vida (Ferrer et al., 2004). Existen diferentes tipos de cepas, que condicionaran los síntomas en corderos; enterotoxigénicas (ECET) o *E. coli* endotóxico, que produce el síndrome de la boca mojada, enteroinvasivas (ECEI) o *E. coli* septicémico, verotoxigénicas (ECVT), enterohemorrágica (ECEH) y las cepas enteropatógenas (ECEP) o *E. coli* diarreico, siendo estas últimas las más comunes en corderos (Lara et al., 2019). Los síntomas más frecuentes son un cuadro diarreico acompañado de pérdida de peso y apatía. Las estirpes ECEP y ECET presentan antígenos fimbriales (F17) muy útiles para el diagnóstico de estas cepas. Diversos estudios aseguran que la mayoría de las cepas de *E. coli* aisladas en corderos y cabritos con diarrea producen este tipo de fimbria (Bautista et al., 2007). El gen EAE se expresa tanto en las cepas EHEC como EPEC (Rodríguez, 2002). Se trata de un gen que codifica la expresión de la intimina, una proteína de membrana externa, la cual se considera un factor más de patogenicidad. Esta proteína es necesaria para la unión íntima entre la bacteria y las microvellosidades, siendo la responsable de las lesiones en el enterocito y de la desorganización de la actina en la célula intestinal donde está adherida (Farfán et al., 2016).

Además de estos agentes, existen otros como coccidios o salmonella que, al no ser comparados durante el estudio de campo, no se explicaran en este trabajo, pero que deben ser recordados a la hora de establecer un diagnóstico diferencial.

2.4. Bacteroides fragilis

Bacteroides fragilis es una bacteria gram negativa no esporulada y anaerobia, capaz de crecer en concentraciones nanomoleculares de oxígeno, lo que explica su éxito en la colonización de las mucosas (Sears et al., 2014). Se encuentra en el tracto digestivo de muchos animales y también en casi todos los seres humanos. Se trata de la bacteria anaerobia más frecuentemente aislada en muestras clínicas humanas. *B. fragilis* es el germen anaerobio más resistente a los antibióticos y representa el 0.3 % de *Bacteroides* spp., pero es el principal agente patógeno de este grupo (Holton, 2008).

Este microorganismo tiene la capacidad de comportarse tanto como comensal, sobre todo en conejos, con efectos digestivos muy beneficiosos, o como un importante patógeno, como demuestran estudios recientes en distintas especies domésticas. Ya en los 80, algunos estudios citaban esta bacteria como posiblemente patógena en corderos (Myers, 1984). Sin embargo, se le atribuyen efectos positivos, como la activación del tejido linfoide intestinal, su participación en la modulación inmunitaria, en especial sobre células T que dificulta la implantación de otras bacterias patógenas, la producción de adhesinas y la estimulación del crecimiento de bacterias saprófitas mediante la fermentación de los carbohidratos a nivel de polisacáridos (Solans et al., 2019).

Entre los efectos negativos destacan la producción de diarreas intensas en diversas especies, sobre todo en el ser humano, lo que se considera una amenaza a nivel global, especialmente en países en vías de desarrollo, siendo el principal causante también de apendicitis y peritonitis. Actualmente se está estudiando su papel en la aparición de cáncer de colon (Zamani et al., 2020).

Existen dos cepas de *B. fragilis*, según su capacidad para secretar una metaloproteasa que actúa como toxina, diferenciándose entre cepas no toxigénicas y toxigénicas. Ambas pueden comportarse como patógenos; las no toxigénicas se caracterizan por ser patógenos oportunistas simbióticos que ayudan con el metabolismo de los polisacáridos y activan las respuestas inmunitarias protectoras del huésped. Por otro lado, las cepas toxigénicas son las responsables de la enfermedad que incluye diarrea inflamatoria, siendo la enterotoxina denominada fragilisina el único factor de virulencia conocido, aunque la colonización asintomática es también muy común (Sears et al., 2014).

Estas metaloproteasas tienen actividad enterotoxigénica como citotóxica; hidrolizan la actina, la miosina, la tropomiosina y el fibrinógeno, pero no la fibronectina, la elastina y la albumina.

Las metaloproteasas son unas toxinas presentes en la flora intestinal, pero no suelen mostrar actividad enterotoxigénica, sin embargo, estudios recientes demuestran que la enterotoxina de *B. fragilis* es la responsable de síntomas diarreicos y producción de daños graves en el intestino como consecuencia de la actividad proteolítica (Pierce et al., 2006). Otras bacterias como *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani* poseen metaloproteasas, sin embargo, en este caso consiguen escindir los enlaces peptídicos de proteínas que regulan los neurotransmisores o *Vibrio cholerae* cuyas metaloproteasas inactivan factores reguladores en el huésped (Fathy et al., 2016).

Las metaloproteasas poseen distintos mecanismos que actúan como factores de virulencia; son capaces de dañar directamente el tejido, inhibir factores del hospedador encargados de la regulación de la respuesta inmune y activar toxinas producidas por microorganismos, entre otras acciones (Sears, 2001).

La enterotoxina purificada es activa en intestino de corderos, conejos y ratas provocando una respuesta (aumento de viscosidad, fluido y hemorragia) dependiente de la dosis. Estos síntomas son consecuencia del aumento de los niveles de sodio y cloruro, sin embargo, se sospecha que este aumento de electrolitos se debe más al daño tisular que a la secreción activa de cloruro transcelular. La respuesta fue más potente y estable en el cordero que en las otras especies estudiadas (Shaoguang et al., 2002).

Estudios demuestran que la inoculación de la enterotoxina de *B. fragilis* daña la mucosa digestiva de los corderos. Aparece inflamación extensa, necrosis y exfoliación de las células epiteliales de superficie, mientras que la inoculación de tampón fosfato salino como muestra control no causa daño en las áreas de inyección, así como en los nódulos linfáticos cercanos, que aparecen intactos (Sears, 2014).

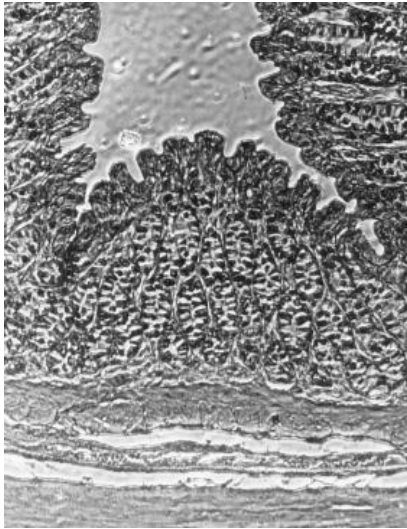


Figura 1. Imagen histológica de la mucosa normal del colón de cordero, tras la inoculación de solución tampón, sin la toxina de *Bacteroides fragilis*, de "Proteolytic Activity of the Bacteroides fragilis enterotoxin Causes Fluid Secretion and Intestinal Damage In Vivo" (Obiso et al., 1995).

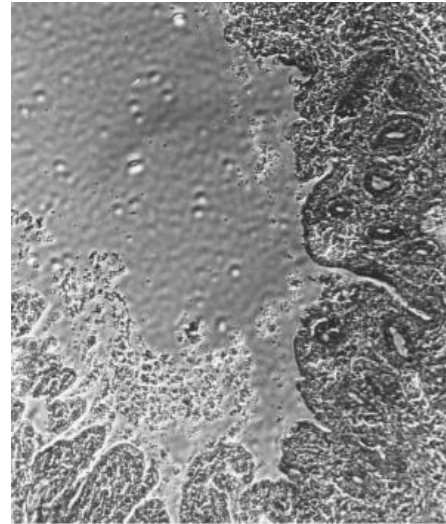


Figura 2. Imagen histológica de las lesiones en la mucosa del colón de cordero, tras la inoculación de 20 microgramos de la toxina de *B. fragilis*. Se observa inflamación extensa, necrosis y exfoliación de las células epiteliales de Proteolytic Activity of the Bacteroides fragilis enterotoxin Causes Fluid Secretion and Intestinal Damage In Vivo" (Obiso et al., 1995).

La diarrea producida por *B. fragilis* enterotoxigénico fue primero observada en algunos animales como terneros y cerdos, y después identificada en seres humanos y asociada también a otras patologías digestivas como cáncer de color, sin embargo, la ruta de infección sigue siendo desconocida (Holton et al., 2008). Algunos estudios afirman que una posible variable podría ser la coinfección de *Bacteroides fragilis* enterotoxigénico y *Clostridium difficile* (Holton et al., 2008).

B. fragilis parece tener todo lo necesario para causar un síndrome diarreico, dado que sobrevive en el ambiente en condiciones aeróbicas, puede colonizar el tracto digestivo de los corderos recién nacidos y acumular líquido en intestino (Myers et al., 1984).

2.5 *Bacteroides fragilis*, patógeno emergente en especies veterinarias

En conejos, *B. fragilis* está apareciendo como un patógeno emergente en las granjas, contribuyendo a los problemas digestivos que siguen siendo la principal causa de pérdidas económicas en las explotaciones cunícolas (Solans et al., 2019).

Malo (2019) realizó un estudio en tres granjas de conejos con presencia de diarreas atípicas. Éstas eran muy líquidas, con focos necróticos en la mucosa del intestino compatibles con *Salmonella*, pero con resultados negativos a esta bacteria y mortalidad especialmente alta, alrededor del 90%, cuando la media se encuentra alrededor del 20%, pero el índice de contagios no fue elevado y las hembras con problemas en un parto solían repetir en los siguientes, entre otros hallazgos.

En las muestras tomadas se aisló *Bacteroides fragilis* que, junto con el cuadro lesional característico y el éxito de la autovacuna hizo pensar que este microorganismo era el responsable, sin embargo, sería necesario, como afirma Malo (2019), reproducir la enfermedad en gazapos para confirmar su participación. El mismo autor explica que la patogenia podría ser el resultado de un desequilibrio entre *Bacteroides* enteropatógeno y no enteropatógeno.

En porcino provoca diarreas grises o enteritis recurrentes predominantes en los momentos de cambio de alimentación (Sitiar, 2000). Esta teoría sobre la patogenicidad de *B. fragilis* enterotoxigénico está apoyada por el aislamiento de esta bacteria en 10 de 45 cerdos con diarrea, de los que siete tenían entre 1 y 4 semanas de edad, mientras que tres sufrieron la diarrea inmediatamente después del destete, en muchos de los lechones aparecieron también otros agentes patógenos bien conocidos (Myers et al., 1987). Sin embargo, otros estudios determinan que se aisló *B. fragilis* como único patógeno sin evidencia de otras etiologías entéricas infecciosas concurrentes en lechones con colitis exfoliativa, confirmando que *B. fragilis* enterotoxigénico puede ser una causa primaria de este tipo de procesos (Sitiar, 2000).

En vacas, existen investigaciones que indican la presencia de *Bacteroides fragilis* como causante de abortos (Kraipowich et al., 2000) y también se ha aislado en el digestivo de terneros. En aves algunos autores lo citan como participante junto con otras bacterias y virus en el síndrome de mala absorción (Bustamante et al., 2010).

Experimentos en modelos animales demuestran que la infección por *Bacteroides fragilis* enterotoxigénico en ratones causa colitis aguda e inflamación persistente del colón, mientras

que aquellos en los que se inocula *Bacteroides fragilis* no enterotoxigénico no mostraron síntomas y exhibieron normalidad histológica (Fathy et al., 2016).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La patología digestiva en corderos es de gran importancia en las explotaciones ovinas, representando elevadas pérdidas económicas, por ello conocer todas las posibles etiologías es de gran utilidad para poder establecer un diagnóstico diferencial completo que posibilite un diagnóstico final y un tratamiento específico.

Si no se realiza un diagnóstico diferencial completo, donde se tienen en cuenta todos los posibles agentes patógenos, el tratamiento puede resultar insuficiente o contraindicado, agravando el problema en el peor de los casos.

Determinar el poder patógeno de *B. fragilis* permitirá establecer si su mera presencia puede ser la causa de una enfermedad o, según la cantidad de esta bacteria, debe considerarse como comensal, como ya ocurre con otras especies.

Bacteroides fragilis es una bacteria con carácter patógeno, emergente en algunas especies como el conejo, por lo que surge la necesidad de establecer su capacidad nociva en corderos de una a tres semanas de edad.

El desconocimiento del poder patógeno de esta bacteria en corderos lactantes hace que sea necesaria la realización de más estudios como el que se ha llevado a cabo para este trabajo cuyos objetivos son:

1. Evaluar la prevalencia de *Bacteroides fragilis* en corderos lactantes entre una y tres semanas de vida.
2. Comparar la presencia de *Bacteroides fragilis* en corderos sanos y enfermos de diferentes explotaciones ovinas.
3. Valorar la conveniencia de incluir *Bacteroides fragilis* en el diagnóstico diferencial de diarreas en corderos lactantes.

4. METODOLOGÍA

4.1 Revisión bibliográfica

En la elaboración de este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica basada en el análisis de publicaciones que mantengan relación con el tema que se trata principalmente en inglés y castellano. Se han utilizado buscadores y bases de datos como Google Scholar, Web of Science, Alcorze, Researchate, etc. Además, se han usado también libros y revistas científicas sobre el tema. Recopilando información de los aspectos más generales, como datos básicos de las diarreas en corderos, su etiología y los factores predisponentes hasta conceptos más específicos como información concreta de la bacteria sujeta a estudio: *Bacteroides fragilis*.

4.2 Estudio de campo

Durante este estudio se han tomado muestras rectales de corderos aparentemente sanos, es decir, sin sintomatología digestiva de 40 explotaciones ovinas situadas en distintos puntos de las tres provincias de la Comunidad Autónoma de Aragón, concretamente se visitaron 22 rebaños en Huesca, 11 en Zaragoza y 7 en Teruel. Por otro lado, se han recopilado datos del laboratorio Exopol S.L. de 40 muestras tomadas en las mismas condiciones excepto que se trataba de corderos con diarrea en los que se había realizado el panel clásico con los agentes más frecuentes, añadiendo además la bacteria sujeta a estudio: *Bacteroides fragilis*.

En todas las explotaciones visitadas se siguió el mismo procedimiento; en primer lugar, se realizó una pequeña encuesta al ganadero o veterinario, en el caso de estar presente, que fue aproximadamente en el 50% de las visitas. Posteriormente, se procedió a la toma de muestras mediante hisopos rectales.

Durante la breve encuesta se recogió información general: localidad y provincia, censo de animales y procedencia de la reposición. Se preguntó también por la alimentación de ovejas y corderos y sobre el manejo del ganado, especialmente de los corderos de la parición, con especial importancia en el aspecto sanitario (patologías frecuentes y en esta parición, desparasitaciones, tratamientos, vacunaciones...) dado que solo se tomaron muestras de corderos sin síntomas y que no hubieran sido tratados.

La toma de muestras se realizó mediante hisopos con medio amies, estériles, aptos para el transporte, de DeltaLab®. El medio contiene, entre otras sustancias iones calcio y magnesio que ayudan a conservar la permeabilidad de las células, asegurando la viabilidad de estas entre 1 y 2 días.



Figura 3. Hisopo utilizado para la toma de muestras.

Durante la toma de muestras se procuró, en todo momento, mantener condiciones asépticas con el fin de no contaminarlas e inducir a confusión en los resultados. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

1. Limpieza de la parte externa del ano del animal.
2. Abrir el envoltorio justo en el momento de tomar la muestra
3. Sacar el hisopo una vez preparado e introducirlo directamente en el recto.
4. Tomar la muestra, abrir el tapón e introducir el hisopo.
5. Comprobar que el tapón queda bien cerrado
6. Identificar con fecha y nombre de la explotación.

En el caso de que no se siga el protocolo, o que exista cualquier sospecha de que el hisopo ha podido contaminarse, desechar el hisopo.

CÓMO MANIPULAR UN HISOPO:

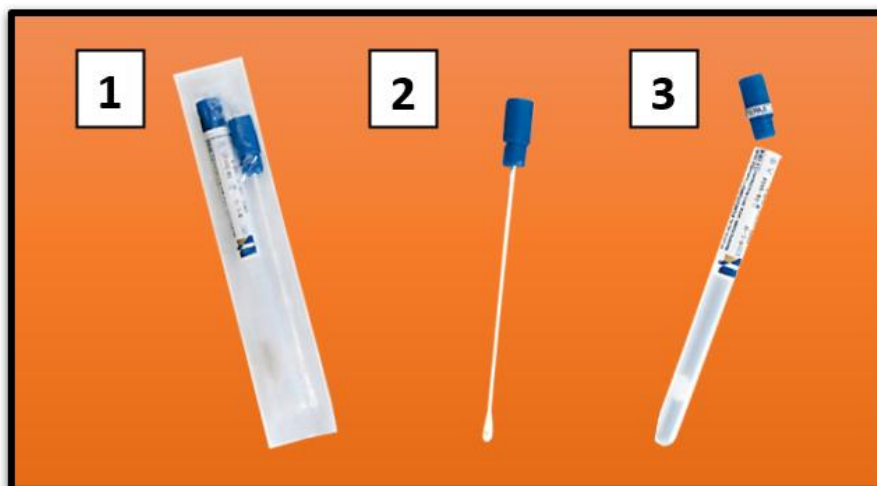


Figura 4. Protocolo de toma de muestras con hisopo

Se recogieron muestras rectales de 5 corderos por explotación dado que se consideró un número suficiente y representativo de la cantidad de corderos en las distintas granjas. La edad de éstos variaba entre una y tres semanas, porque es la época crítica en la que aparecen diarreas en estos animales, siendo los muestreados corderos asintomáticos. Se valoró el estado general de los lactantes; especialmente la vitalidad, evitando aquellos corderos apáticos y apartados del grupo principal. Por otro lado, se tuvo en cuenta también el aspecto de las heces y grado de suciedad de las patas traseras y ano, evitando aquellos que no estuvieran limpios.



Figura 5. Toma de muestras.

Este estudio fue valorado por la comisión ética asesora para la experimentación animal de la universidad de Zaragoza para el control de buena práctica en la docencia, la cual emitió un informe favorable dado que “el diseño cumple los principios éticos y de protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”.

4.3 Estudio de laboratorio

El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante un *pool* de las 5 muestras tomadas, por parte de Laboratorios Exopol S.L.. Se realizó un panel clásico de diarreas mediante PCR en el que se

incluía Rotavirus tipo A, *Cl. Perfringens*, *Escherichia Coli*, F17, *E. coli gen eae*, *Cryptosporidium parvum*, añadiendo además *Bacteroides fragilis* entre los agentes buscados

4.4 Análisis de los datos

Una vez obtenidos todos los resultados de las 80 muestras (40 de corderos sanos y 40 de corderos enfermos) se realizó una tabla con el programa Excel con el fin de facilitar la comparación de los resultados, la cual se realizó de todos los agentes prestando especial atención a *Bacteroides fragilis*.

Para el análisis de los datos recogidos se agruparon los resultados en grupos dependiendo de su Cq. “El ciclo threshold (Cq) definido como el ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa el valor umbral, es indicativo del número inicial de copias diana, y es menor cuanto mayor es dicho número de copia” (Benito et al., 2015). En base a esto y con el fin de facilitar las comparaciones y el análisis se utilizó el siguiente criterio:

- Cq < 22: nivel alto
- Cq > 22 y < 33: nivel medio
- Cq > 33 nivel bajo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez recogidos todos los datos, se procedió a su análisis. Los resultados de las 40 muestras tomadas en corderos sanos fueron los siguientes: todas las muestras fueron negativas a rotavirus excepto una, por lo que uno de los corderos muestreados se encontraría en la fase de incubación de la enfermedad dado que la Cq presenta un valor alto (37,02), lo que daría explicación a la ausencia de síntomas o bien, también se podría considerar una contaminación ambiental.

| Valores Cq: | APARENTEMENTE SANOS (total = 40) | | | | ENFERMOS (total = 40) | | | |
|-------------|-----------------------------------|----------|--------|-----|--------------------------------|----------|--------|-----|
| | CQ < 22 (concentración alta) | CQ MEDIA | CQ >33 | NEG | CQ <22 (concentración alta) | CQ MEDIA | CQ >33 | NEG |
| ROTAVIRUS | - | - | 1 | 39 | - | - | 4 | 36 |
| CRYPSTOSP. | - | 2 | 2 | 36 | - | 15 | 4 | 21 |
| CL.PERFRING | - | 11 | 18 | 11 | 4 | 21 | 10 | 5 |
| B. FRAGILIS | 1 | 33 | 1 | 5 | 4 | 14 | 4 | 18 |
| F17 | - | 39 | 1 | - | 5 | 31 | 1 | 3 |
| GEN EAE | 3 | 31 | 3 | 3 | 2 | 15 | 7 | 16 |

Figura 6: tabla resumen de los resultados obtenidos

En cuanto a *Cryptosporidium parvum*, en los corderos aparentemente sanos, tan solo un 10% resultó positivo, mientras que, en los corderos con síntomas fue el 46%. En el análisis de *Clostridium perfringens*, el 70% de las muestras de corderos sin sintomatología resultó positiva, en cambio, en los corderos enfermos, el 83%. El factor F17 fue positivo en el 100% de las muestras en corderos asintomáticos y del 93% de los corderos enfermos, el gen EAE fue positivo en el 92,5% de las muestras sin sintomatología y en el 61% de los corderos con diarreas.

En cuanto a *Bacteroides fragilis*, el 85% de las muestras de corderos asintomáticos resultaron positivas, mientras que de los corderos con diarrea, solo el 51% de las muestras.

En cuanto a los valores de Cq, en los corderos sin sintomatología, únicamente una muestra resultó alta (21,6), es decir solo el 3,44% de las muestras positivas a *B. fragilis* alcanzaron un Cq por debajo de 22. Mientras que en los enfermos; cuatro de las 22 muestras positivas a este agente, alcanzaron un valor Cq alto, es decir un 18,18%.

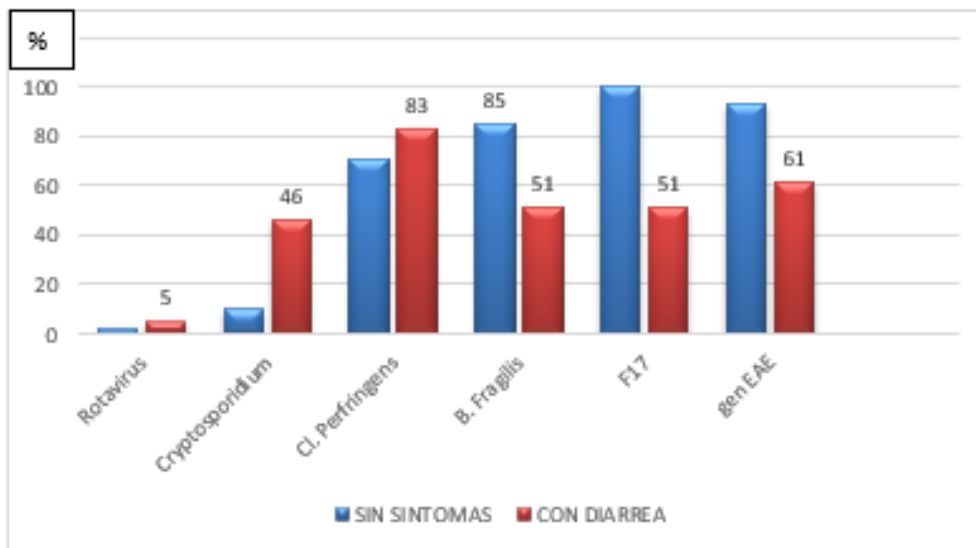


Figura 7: Gráfico porcentual de la cantidad de muestras positivas en los dos grupos estudiados.

A pesar de que se encuentra en corderos tanto enfermos como aquellos sin síntomas, sí que se aprecian diferencias entre ambos grupos. Encontramos un mayor porcentaje de muestras positivas en corderos sin síntomas, que en corderos con diarreas, suponiendo un 85% frente a un 51%, hecho que ocurre también con el Factor F17 y el gen EAE ambos de E.Coli, dado que esta bacteria es uno de los principales agentes comensales del digestivo de estos animales.

Por otro lado, *Rotavirus*, *Cryptosporidium parvum* y *Clostridium perfringens* son más abundantes en los corderos con sintomatología digestiva.

Según estos datos no se podría calificar a *B. fragilis* como patógeno primario, sino que podría considerarse una bacteria comensal del digestivo de estos animales, aunque no se puede descartar que pudiera provocar enfermedad en caso de disbiosis, aspecto que hace necesario más estudios alrededor de este tema.

Entre aquellos corderos positivos a *Bacteroides fragilis*, es conveniente diferenciar entre los individuos con Cq alta, de aquellos que poseen una Cq baja, y que, por lo tanto, el patógeno se encuentra en mayor concentración.

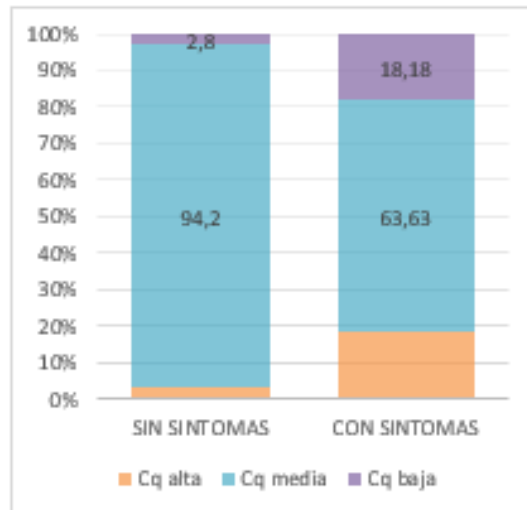


Figura 8: Gráfico porcentual acumulativo según el valor Cq de B. Fragilis.

Como se puede observar en el diagrama, en los dos grupos de corderos sometidos a estudio predominan los valores de cQ medios, siendo más abundantes en el grupo de corderos sin síntomas que suman el 94,2% de las muestras positivas.

En cambio, en aquellos corderos con síntomas digestivos los valores Cq bajos, es decir las muestras con concentraciones altas de *Bacteroides fragilis* son más predominantes. Los resultados con Cq baja son las que se pueden considerar muestras “realmente positivas”.

Este resultado muestra un indicio de que a concentraciones altas el patógeno podría estar involucrado en la patología, posiblemente como agente secundario.

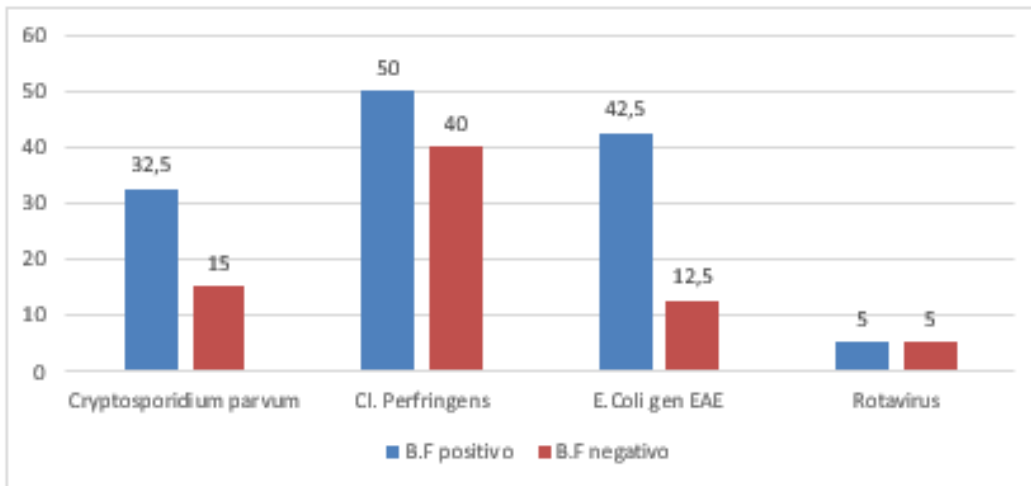


Figura 9. Asociación entre B. Fragilis y otros agentes enteropatógenos estudiados.

En la Figura 9 se puede observar como en los animales enfermos la presencia de *B. fragilis* supone un incremento en la presencia del resto de agentes enteropatógenos, es decir, la cantidad de muestras positivas a los distintos agentes patógenos es mayor en los casos en los que el análisis de *Bacteroides fragilis* es positivo. Este hallazgo se observa en *Cryptosporidium parvum*, *Clostridium perfringens* y *E. coli* gen EAE, no se observa en Rotavirus, dado, posiblemente a la escasez de muestras positivas.

Sin embargo, se realizó también la prueba χ Cuadrado, la cual mide la existencia de asociación entre dos variables cualitativas, comparando los resultados obtenidos con los esperados. En este caso, presencia de diarrea y resultado de PCR para *B. fragilis* positivo o negativo. El resultado de esta prueba fue $p=0,23$, resultado que se considera estadísticamente no significativo, por lo que con las muestras tomadas no se afirma que existe relación entre ambas variables.

Por último, analizando los resultados obtenidos de las 40 muestras tomadas en corderos diarreicos, 36 resultaron positivas para al menos dos de los agentes estudiados. Considerando muestras positivas a las $cQ < 33$, es decir desestimando aquellos valores altos, que indican presencia baja del agente.

Entre los corderos restantes, uno resulto negativo a todos los agentes estudiados y el resto obtuvieron valores altos de Cq para alguno de los patógenos estudiados (figura 10).



Figura 10. Relación entre la etiología (única o múltiple) del proceso diarreico.

Estos resultados permiten reafirmar el carácter multifactorial de las diarreas dado que la inmensa mayoría de las muestras tomadas en corderos enfermos resultaron positivas a al menos dos agentes.

6. CONCLUSIONES

La bacteria sometida a estudio, *Bacteroides fragilis* se encuentra tanto en corderos lactantes sin síntomas como en aquellos que presentan diarrea. En el 68% de los corderos analizados las muestras resultan positivas para este agente, siendo el 14,2% de estas muestras valores Cq bajos, es decir concentraciones altas de esta bacteria.

Al analizar los resultados del panel digestivo en corderos enfermos, se puede afirmar que la concentración de los distintos agentes estudiados es mayor en aquellas muestras donde *Bacteroides fragilis* es positivo, por lo que tal vez la realización de más análisis podría llegar a confirmar que esta bacteria interviene o facilita la multiplicación de otros enteropatógenos como *Cryptosporidium parvum*, *Cl. perfringens* o *E. coli*.

En base a las muestras tomadas aparecen diferencias en la concentración en la que se encuentra *Bacteroides fragilis*, dado que en las muestras tomadas a corderos enfermos el porcentaje es mucho mayor que en aquellas tomadas en corderos con diarrea. Sería necesario mayor número de muestras para confirmar un posible efecto positivo.

Por lo tanto, teniendo en cuenta el análisis y las conclusiones tomadas en base a los datos recopilados en este estudio, no sería necesario incluir la bacteria *B. fragilis* en el diagnóstico diferencial de diarreas en corderos de entre una y tres semanas, aunque no se podría afirmar que no participe como agente secundario en la evolución de la enfermedad.

CONCLUSIONS

The bacteria under study, *Bacteroides fragilis*, is found in both symptom-free lactating lambs and those with diarrhea. In 68% of the lambs analyzed, the samples were positive for this agent, with 14.2% of these samples being low Cq values, that is, high concentrations of this bacterium.

When analyzing the results of the digestive panel in sick lambs, it can be affirmed that the concentration of the different agents studied is higher in those samples where *Bacteroides fragilis* is positive, so perhaps further analysis could confirm that this bacterium it intervenes or facilitates the multiplication of other enteropathogens such as *Cryptosporidium parvum*, *Cl. perfringens* or *E. coli*.

Based on the samples taken, differences appear in the concentration in which *Bacteroides fragilis* is found, since in the samples taken from sick lambs the percentage is much higher than

in those taken from lambs with diarrhea. A larger number of samples would be necessary to confirm a possible positive effect.

Therefore, taking into account the analysis and the conclusions taken based on the data collected in this study, it would not be necessary to include the bacterium *B. fragilis* in the differential diagnosis of diarrhea in lambs between one and three weeks old, although it is not possible to affirm that it does not participate as a secondary agent in the evolution of the disease.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Una vez finalizado el estudio, me dispongo a valorar mi experiencia durante la realización de este trabajo en todas sus fases.

En primer lugar, la elección del tema nace del interés por esta especie desde el inicio de la carrera, y, por ser las diarreas en corderos un aspecto de importancia actual en las explotaciones ovinas y el hecho de que, mediante estudios científicos como este se puede ayudar tanto al ganadero como al veterinario a una buena gestión de estos problemas.

Durante la revisión bibliográfica realizada para la realización de este Trabajo Final de Grado, además de afianzar muchos conceptos aprendidos durante los últimos cursos de Veterinaria, he podido profundizar en este tema, ampliando mis conocimientos y mejorando la terminología veterinaria, lo que me ha permitido disfrutar durante el tiempo dedicado a esta parte.

Creo que es importante recalcar el enorme aprendizaje que ha supuesto para mi la realización de una buena búsqueda bibliográfica basada en la síntesis de información dado que, en este momento, donde existe un exceso de información, saber buscar, contrastar y citar estudios científicos de cualquier parte del mundo, se hace imprescindible para el desarrollo de muchas actividades relacionadas con esta profesión.

Por otro lado, el estudio de campo, ha sido la parte más enriquecedora para mi; el contacto con el medio rural, el ganadero o ganadera, los animales y el veterinario o veterinaria, me ha aportado una experiencia muy provechosa poco explotada en los años de Universidad. Se trata de un acercamiento real, que permite aprender desde el primer momento, en este caso me gustaría destacar la práctica a la hora de tomar muestras y las breves conversaciones con los ganaderos, donde percibes pinceladas de sus preocupaciones, intereses, curiosidades... siendo aspectos de gran interés para un futuro éxito profesional.

Quiero señalar que el punto de estudio comparación y resultados de los datos ha sido la parte que más esfuerzo me ha llevado, dado mi escasa experiencia en el ámbito del análisis de información y análisis estadístico. Sin embargo, gracias a la realización de este trabajo he aprendido y afianzado una base sólida en el uso de programas como Excel, imprescindible para posteriores análisis.

Por último, me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo. En primer lugar, a todos los ganaderos y ganaderas que han permitido la toma de muestras de sus corderos, también a todos los veterinarios que han facilitado el contacto con el ganadero; especialmente al GTV, la Cooperativa SCLASS, a Marcos Pons y a Marta Ruiz.

De igual forma me gustaría agradecer a laboratorio EXOPOL por la propuesta de tema y el gran trabajo realizado durante el análisis de todas las muestras estudiadas en este estudio, además de los consejos y ayuda prestada durante la realización del mismo. Además, este trabajo tampoco hubiera sido posible sin la ayuda de mis compañeros y profesores del Servicio Clínico de Rumiantes; especialmente dar las gracias a Juan José Ramos y Delia Lacasta.

8. BIBLIOGRAFÍA

Bautista, M. G., y Vázquez, M. D. C. (2007). Diagnóstico de las diarreas neonatales en pequeños rumiantes. *Albéitar*, (106), pp. 34-39. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n5p2387

Benito, A. A., Arnal, J. D., Serrano, J. D., Borobia, M. y Pradas, L. (2015). Diagnóstico de problemas reproductivos porcinos mediante PCR en tiempo real. *Albéitar* 175. Disponible en : <https://www.portalveterinaria.com/porcino/articulos/11705/diagnostico-de-problemas-reproductivos-porcinos-mediante-pcr-en-tiempo-real.html> [Consultado 20-08-2020]

Bresciani, K. D. S., de Aquino, M. C. C., Zucatto, A. S., Inácio, S. V., da Silveira Neto, L., Coelho, N. M. D. y Meireles, M. V. (2013). Cryptosporidiosis in livestock and pets: epidemiological aspects. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(5), pp. 2387-2402.

Bustamante, D. y Chavez, M. (2010). Síndrome de Mala Absorción en aves. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 11(12),1-20. Disponible en: HYPERLINK <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=636/63616936011>. [Consultado 30-07-2020]

Chatzopoulos, D. C., Athanasiou, L. V., Spyrou, V., Fthenakis, G. C. y Billinis, C. (2013). Rotavirus infections in domestic animals. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 64(2), pp. 145-160.

De Oliveira, S., Wilmsen, M. O. y Rosalinski-Moraes, F. (2016). Criptosporidiose em ruminantes: revisão. *PUBVET*, 6, pp. 1307.

Espinosa, J. G. (2004). Diarreas neonatales en corderos y cabritos. *MG Mundo ganadero*, 15(164), pp. 38-39.

Fathi, P. y Wu, S. (2016). Suppl-1, M3: Isolation, Detection, and Characterization of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Clinical Samples. *The open microbiology journal*, 10, pp. 57. DOI: 10.2174/1874285801610010057.

Ferrer, L. M., Gonzalez, J.M, De las Heras, M., García, J.A y Ramos, J. J. (2004). Diarreas en corderos. Cuadernos de campo, Ed. Ivomec., Zaragoza (España).

Ferrer, L. M., Ramos, J. J., Lacasta, D., Figueras, L., González, J. M., Callejas, M. y Congost, S. (2007). Las diarreas del cordero, un problema multifactorial. *Informaciones Técnicas-Gobierno de Aragón, Centro de Técnicas Agrarias (España)*.

Farfán, A. E., Ariza, S. C., Vargas, F. A. y Vargas, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33(4), pp. 438-450.

Gökçe, E., Ünver, A. y Erdoğan, H. M. (2010). Enteric pathogens in the aetiology of diarrhoea in neonatal lambs. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(5), pp. 717-722.

Holton, J. (2008). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Current Infectious Disease Reports*, 10(2), pp. 99-104.

Kraipowich, N. R., Morris, D. L., Thompson, G. L., y Mason, G. L. (2000). Bovine abortions associated with *Bacteroides fragilis* fetal infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(4), pp. 369-371. Disponible en: <http://vetdergi.kafkas.edu.tr> [Consultado 15-07-2020]

Lacasta, D., Ramos, J. J., Gonzalez, J. M, Ortega, M, Garciandia, A. y Alcay, C. (2013). Diarreas en corderos: Etiología. *Tierras Ovino* (006), pp. 16-32.

Lara, J. A., Bañuelos, R., Delgadillo, L. y Delgadillo, O. (2019). Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 in feces of lactating ruminants with diarrheal syndrome. *Revista MVZ Córdoba*, 24(3), pp. 7339-7345. DOI: <http://dx.doi.org/10.21897/rmvz.1232>

Lindsay Pérez, E. (2019). *Diarreas neonatales en pequeños rumiantes: prevalencia de Escherichia coli, Salmonella spp. Clostridium spp. y Cryptosporidium parvum en la Comunidad Valenciana* (Bachelor's thesis).

Malo, M. (2019) *Bacteroides fragilis* enteropatógeno: ¿Enfermedad emergente o hallazgo clínico? *In Proceedings of the XLIV 44th Symposium de Cunicultura de ASESCU, Aranda de Duero, España*, pp. 83–86. Disponible en: <https://asescu.com/wp-content/uploads/2019/06/L-Actas-44-Symposium-ASESCU-ArandaDuero.pdf> [Consultado 01-07-2020].

Myers, L. L., Firehammer, B. D., Shoop, D. S. y Border, M. M. (1984). *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. *Infection and immunity*, 44(2), pp. 241-244.

Myers, L. L., y Shoop, D. S. (1987). Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in young pigs. *American journal of veterinary research*, 48(5), pp. 774-775.

Obiso, R. J., Lyerly, D. M., Van Tassell, R. L. y Wilkins, T. D. (1995). Proteolytic activity of the *Bacteroides fragilis* enterotoxin causes fluid secretion and intestinal damage in vivo. *Infection and immunity*, 63(10), pp. 3820-3826.

Pierce, J. V. y Bernstein, H. D. (2016). Genomic diversity of enterotoxigenic strains of *Bacteroides fragilis*. *PloS one*, 11(6), e0158171.

Rasool, S., Hussain, I., Wani, S. A., Kashoo, Z. A., Beigh, Q., Nyrah, Q. ... y Qureshi, S. (2017). Healthy and Diarrhoeic Sheep and Goats in Kashmir, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10), 3174-3184. Disponible en [HYPERLINK "http://www.entomoljournal.com/archives/2020/vol8issue1/PartI/8-1-14-886.pdf"](http://www.entomoljournal.com/archives/2020/vol8issue1/PartI/8-1-14-886.pdf)

[Consultado 05-07-2020]

Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), pp. 464-475. Disponible en: [HYPERLINK "http://www.insp.mx/salud/index.html"](http://www.insp.mx/salud/index.html) [Consultado 01-07-2020].

Saíz, J. M. G. y Ferrer, L: M. (2013). Importancia de las diarreas neonatales en los corderos. *Tierras. Ovino*, (6), pp. 8-13.

Sears, C. L. (2001). The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicon*, 39(11), pp.1737-1746. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00160-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00160-X)

Sears, C. L., Geis, A. L. y Housseau, F. (2014). *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis. *The journal of clinical investigation* 24(10), pp. 4166-4172. DOI: 10.1172/JCI72334

Sitjar, M. (2000). Enfermedades entéricas en porcino. *Información Veterinaria*, (213), pp. 35-40. Disponible en: HYPERLINK "<http://www.laboratoriollamas.com.ar/wp-content/uploads/2012/08/Enteritis-en-Porcinos.pdf>" [Consultado 25-07-2020].

Solans, L., Arnal, J. L., Sanz, C., Benito, A., Chacón, G., Alzuguren, O. y Fernández, A. B. (2019). Rabbit Enteropathies on Commercial Farms in the Iberian Peninsula: Etiological Agents Identified in 2018–2019. *Animals*, 9(12), 1142. DOI: 10.3390/ani9121142

Shaoguang, W., Lawrence, A., Dreyfus, O., Tzianabos, y Sears, L. (2002). Diversity of the Metalloprotease Toxin Produced by Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Infection and Immunity* 70 (5), pp. 2463-2471; DOI: 10.1128/IAI.70.5.2463-2471.200.

Zamani, S., Taslimi, R., Sarabi, A., Jasemi, S., Sechi, L. A. y Feizabadi, M. M. (2020). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: A possible etiological candidate for bacterially-induced colorectal precancerous and cancerous lesions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, pp. 449. DOI: 10.3389/FCIMB.2019.00449