

# Procesos digestivos en rumiantes: toma de muestras

**Muchas veces se puede hacer un diagnóstico presuntivo de la etiología de un proceso digestivo a partir de los signos clínicos, edad, situación vacunal, historial de la explotación, epidemiología del proceso y datos de la necropsia.**

**Sin embargo, en ocasiones existen variaciones en los síntomas clínicos observables debidos a un patógeno, o bien concurren varios patógenos, por lo que para realizar un diagnóstico correcto tenemos que acudir al laboratorio.**

**I. Albizu y R. Baselga**  
Exopol. Autovacunas y Diagnóstico.  
San Mateo (Zaragoza)

**E**n este trabajo se orienta la toma de muestras en procesos digestivos y se comentan algunos de los resultados que se pueden obtener. En todos los casos, se debe considerar que no todos los laboratorios utilizan las mismas técnicas, por lo que conviene confirmar siempre las muestras a enviar.

Es fundamental enviar la historia clínica e informar de la edad de los animales muestreados.

### Etiología

En rumiantes antes del destete, la mayoría de las diarreas infecciosas se producen por *Escherichia coli*,

*Clostridium perfringens* y *Criptosporidium parvum*. Tras el destete, la mayoría de las diarreas se producen por *E. coli*, Clostridios y Coccidios.

Rotavirus, Coronavirus, BVD, (Border Disease en pequeños rumiantes) e IBR en bovino, también son muy frecuentes y muy importantes, especialmente en el caso del ganado vacuno. De hecho, en animales lecheros con altas tasas de reposición (tanto en bovino como ovino-caprino) existe poca "inmunidad de rebaño" y son frecuentes los virus. Por el contrario, en vacas y ovejas de carne son infrecuentes.

*Salmonella spp* tiene una prevalencia mucho menor, mientras que no está claro cuál puede ser el papel de otros agentes como *Clostridium difficile*, *Candida albicans* y los integrantes de los géneros *Giardia*, *Campylobacter*, *Chlamydia* y *Yersinia*, que sí se han descrito como patógenos en otras especies, incluyendo el hombre. Aún así, en el laboratorio de los autores ya trabajan rutinariamente con alguno de estos patógenos.

En animales adultos, la preocupación fundamental deben ser los pará-

**Figura 1. Edades más probables en las que aparecen las diarreas producidas por los diferentes patógenos en ovino-caprino y bovino.**

24 horas	5 días	3 semanas	5 semanas	10 semanas	Recría	Adultos	
		Colibacilosis					
<i>C. perfringens</i> B y C							
		<i>C. perfringens</i> A y D					
					<i>C. perfringens</i> D		
	Rotavirus, Coronavirus, BVD/Border, IBR						
	Criptosporidium						
	Coccidios						
						Paratuberculosis	
			Parásitos intestinales				

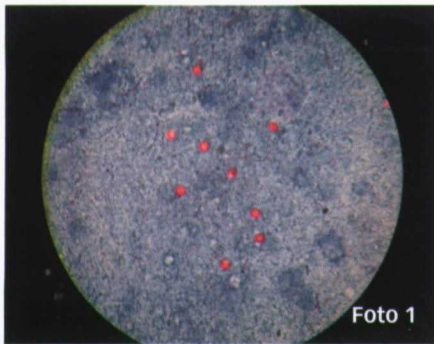


Foto 1



Foto 2



Foto 3

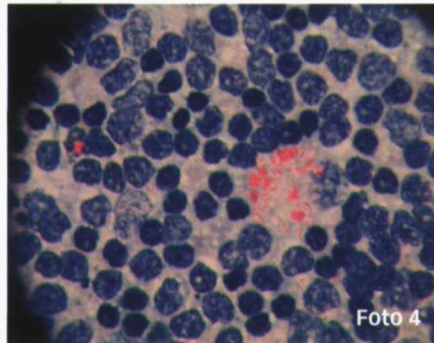


Foto 4



Foto 5

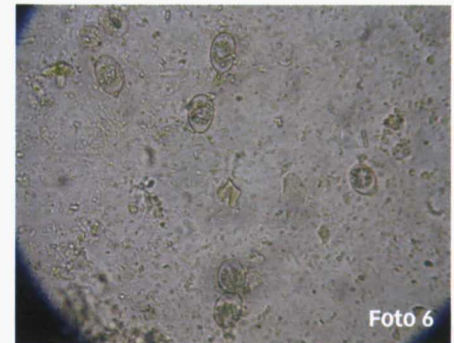


Foto 6

**Foto 1.** *Cryptosporidium parvum*. Frotis a partir de un hisopo rectal de bovino lactante con diarrea. Se realizó una tinción de Ziehl Neelsen modificada. Se observan los ooquistes del parásito en color rosa intenso sobre un fondo verdoso. Observación en microscopía de campo claro x1000. Autor: Exopol.

**Foto 2.** Intestinos delgados de dos corderos lactantes de 10-15 días con problemas digestivos. En el intestino superior se observa una enteritis catarral con ligera inflamación, y en la cual se observaron abundantes criptosporidios, no aislándose ningún agente bacteriano en el cultivo microbiológico. En el intestino inferior se observa un contenido negruzco, y tras el estudio microscópico, el intestino no mostraba lesiones inflamatorias, ni necróticas, sugiriendo que el origen del contenido hemorrágico procedía de tramos anteriores, probablemente abomasal. En este intestino tampoco se aisló ningún agente bacteriano, observándose solamente algunos cryptosporidios. Autor: Exopol.

**Foto 3.** Cepa de *Escherichia coli* crecida en Agar MacConkey a 37 °C 24 h. Obsérvese el color rosa de las colonias debido a la fermentación de la lactosa y el aspecto seco. Autor: Exopol.

**Foto 4.** *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Tinción Ziehl-Neelsen de frotis de intestino de una cabra. Microscopía de campo claro 1000x. Autor: Exopol.

**Foto 5.** Intestino de cordero de cebo con hemorragias multifocales. Microscópicamente, se observa una moderada enteritis crónica con fenómenos degenerativos y proliferativos en las criptas y vellosidades, así como abundantes coccidios parasitando el epitelio intestinal, lo cuales se corresponden con los nodulillos observados macroscópicamente, y extensas hemorragias localizadas en la submucosa. Autor: Exopol.

**Foto 6.** Ooquistes de coccidios sin esporular, observados en un estudio coprológico a partir de heces. Se realizó una técnica de flotación con sulfato de zinc. Observación en microscopía de campo claro x400 en fresco.

sitos y la Paratuberculosis, aunque el blandeo o la diarrea puede ser un síntoma inespecífico de otros procesos.

En la mayoría de estos casos, las lesiones microscópicas asociadas a los diferentes patógenos son críticas en los problemas digestivos.

Es normal identificar la presencia de más de un patógeno en las muestras recibidas y corresponde al veterinario llegar al diagnóstico definitivo con los datos de que dispone de la explotación. En estos casos el laboratorio debe asesorar para poder discernir la causa principal.

Hay que prestar también atención a las diarreas que tienen una etiología de tipo no infeccioso: meteorismo,

acidosis ruminal, úlceras, desplazamiento abomasal, alteraciones de flora intestinal, etc.

### Toma de datos

Conviene tomar los datos clínicos de cualquier proceso, porque comparar las características del mismo con los resultados del laboratorio, el resultado del tratamiento, los cambios de manejo y la evolución en el tiempo es, sin ninguna duda, una fuente fundamental de conocimiento.

La edad a la que los lactantes se ven afectados por la diarrea por primera vez es una indicación de la causa. La diarrea que aparece al primer o segundo día de nacimiento probable- >>

### Tipificación de *Escherichia coli*

La tipificación de *Escherichia coli* se puede hacer comparando el ADN mediante técnicas moleculares o comparando sus características fenotípicas.

En la **Figura 2** se ve que los aislamientos de los lactantes 2, 3 y 4 pertenecen a la misma cepa y el 1 y el 5 difieren de los otros y entre sí, por lo que pertenecen a cepas distintas. En el eje de abscisas se indican unos valores que van del 50 al 100%. Un 100% indica que las cepas que se comparan han dado el mismo resultado en todas las pruebas realizadas. Como seres vivos que son, siempre existe una variabilidad, aunque las cepas aisladas procedan del mismo clon (sean iguales), por eso se utiliza un punto de corte algo inferior, pero muy exigente; en este caso un 98% de similitud. El punto de corte se representa en la línea de puntos. Los aislamientos que se agrupan (líneas verticales) a la derecha de la línea de corte, son iguales entre sí y pertenecen a la misma cepa, mientras que los que se agrupan a la izquierda son diferentes.

La tipificación, permite seleccionar las cepas responsables del problema en las que posteriormente se puede determinar los factores de virulencia, valorar la sensibilidad antibiótica, calcular la concentración mínima inhibitoria frente a diversos antibióticos, o con las que elaborar autovacunas, incluyendo una o más cepas. Del mismo modo, se puede comparar cepas aisladas en diferentes naves de la misma explotación, en distintas explotaciones, cepas obtenidas en diferentes fechas o momentos productivos, etc., y así ayudar a comprender la epidemiología de muchos procesos causados por *E. coli*.

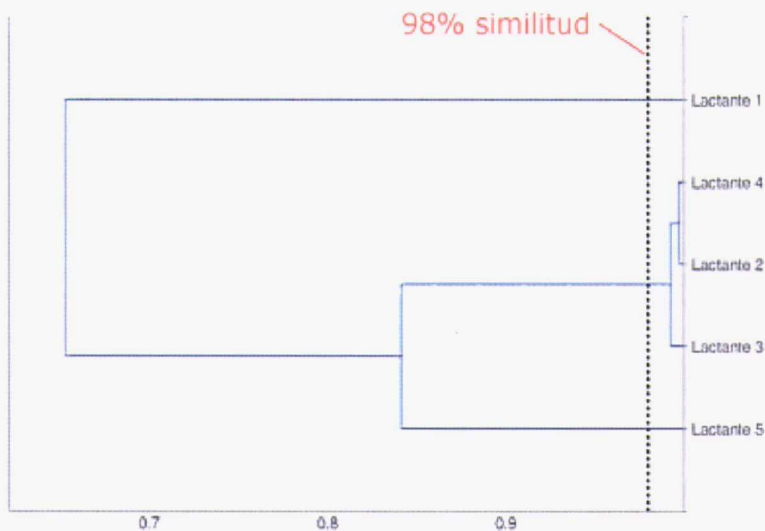


Figura 2

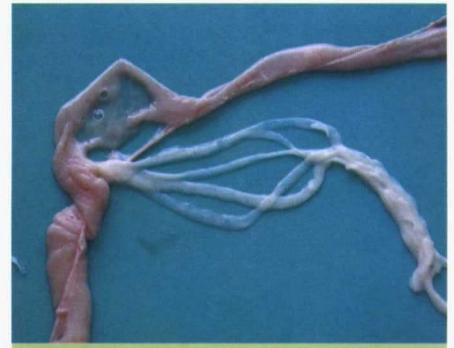


Foto 7. *Moniezia expansa* en intestino delgado de un ovino. Autor: Exopol.



Foto 8. Rotavirus detectado en células de intestino delgado de bovino lactante mediante inmunoperoxidasa indirecta. Se empleó un anticuerpo monoclonal específico de grupo (reconoce la proteína VP6, Chemicon). Sustrato AEC en DMF. Contraste Hematoxilina de Mayer. Campo claro 1000 x. Autor: Exopol.



Foto 9. Asas intestinales de un cabrito de dos meses de edad que presentaba un cuadro diarreico y al que se le diagnosticó Coccidiosis. A través de la pared intestinal se observan lesiones nodulares blanquecinas asentadas en la mucosa del intestino delgado, provocadas por el parásito. Autor: Exopol.

**“ Hay otros factores como un encalostramiento deficiente o el agua de mala calidad que favorecen la aparición de diarreas**

mente está producida por *E. coli* o *C. perfringens* B y C. La Coccidiosis surge a partir de los 15-30 días de edad, mientras que el Criptosporidio es más severo en animales de menos de 1 mes. En la **Figura 1** se detallan las edades aproximadas en que aparecen

las diferentes diarreas. El aspecto de las heces y las lesiones observadas en la necropsia también ayudan a identificar el origen de las diarreas.

A menudo, cuando se produce diarrea en los lactantes, toda la paridera se ve afectada, porque los procesos

son infecciosos y contagiosos. La Clostridiosis es una excepción y normalmente sólo aparecen afectados algunos animales, que a menudo son los de mayor tamaño y más sanos. Las bajas temperaturas y la falta de leche (hipoglucemia), un deficiente encalostamiento, agua de mala calidad, deficiencias vitamínicas, etc., favorecen la aparición de diarreas. En procesos sobreagudos producidos por toxinas de *E. coli* o *C. perfringens*, normalmente no se observa diarrea, sino bajas súbitas o animales con sintomatología nerviosa.

### Técnicas diagnósticas

La toma de muestras debe estar orientada por cada laboratorio ya que no todos cubren todas las posibilidades, ni emplean las mismas técnicas. Esto puede ser un inconveniente porque complica el envío de muestras y la interpretación de los resultados, pero al mismo tiempo amplía el panel de patógenos y de posibilidades al alcance del veterinario. Se han puesto a punto y se han publicado muchas técnicas diferentes, pero muchas no están disponibles comercialmente. El Cuadro I indica las técnicas habitualmente disponibles para el diagnóstico de los procesos diarreicos en rumiantes para cada uno de los principales patógenos implicados

Las técnicas de laboratorio se dividen esencialmente en directas, en las que se aísla (cultivo) o identifica el patógeno fundamentalmente a través de sus antígenos (IPX/IF) o su ADN (PCR), o indirectas donde se detecta la respuesta humoral (anticuerpos, serología) o celular (como por ejemplo en la Tuberculosis) del organismo frente al patógeno. Lógicamente algunas técnicas como el aislamiento viral o incluso la mayoría de los PCR no son técnicas de rutina. En problemas digestivos los diagnósticos indirectos son poco útiles salvo frente a Paratuberculosis.

Con todas las técnicas conviene recordar lo dicho en el apartado anterior sobre la calidad de una técnica diagnóstica.

### Toma de muestras

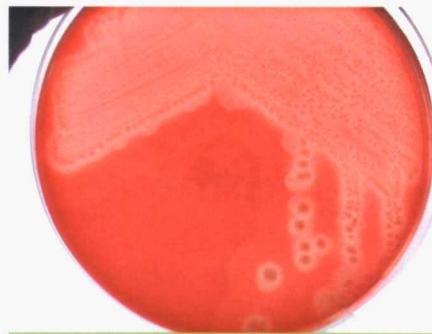
La mejor muestra es el paquete intestinal de uno o varios animales en- >>

Cuadro I. Técnicas habitualmente disponibles para el diagnóstico de procesos diarreicos en rumiantes.

	IPX/IF	PCR	Cultivo	Serología	Coprología Identificación morfológica
<b>Virus</b>			NDC		
BVD/Border	Sí	Sí		Sí	
IBR	Sí	Sí		Vacas	
Rotavirus	Sí	Sí		Vacas	
Coronavirus	Sí	Sí		Vacas	
<b>Bacterias</b>			La mayoría		
<i>Escherichia coli</i>			Sí		
<i>Salmonella</i>			Sí		
Paratuberculosis		Sí	NDC*	Sí	
<i>Clostridium</i>			Sí	Toxinas	
<i>Chlamydia</i>		Sí	NDC		
<b>Parásitos</b>					Todos
<i>Criptosporidium</i>					Sí
<i>Coccidios</i>					Sí

IPX/IF. Inmunoperoxidasa/Inmunofluorescencia; Cultivo. Casi todos los virus se pueden cultivar pero no se hace como rutina; Serología. Se pueden buscar anticuerpos en madres y en lactantes.

NDC. No disponibles comercialmente.



**Foto 10.** Cepa de *Clostridium perfringens* aislado de intestino delgado de un ovino con síntomas de enterotoxemia. Crecimiento en agar sangre de carnero en atmósfera anaerobia a 37 °C durante 48 h. Obsérvese la doble hemólisis que rodea a las colonias, típica de *Cl. perfringens*. Autor: Exopol.



**Foto 11.** Ternero lactante con una abomasitis hemorrágica y ulcerativa por *Clostridium perfringens* tipo A. Microscópicamente, se observaron lesiones severas en el abomaso, mientras que el intestino delgado no mostraba lesiones significativas, siendo el contenido hemorrágico observado macroscópicamente procedente de tramos anteriores, probablemente del abomaso. De las lesiones, se aisló el *Clostridium* determinándose su tipo de toxina, y encontrándose que sólo tenía la toxina alfa, siendo negativo para las toxinas beta y epsilon (toxinas de los *C. perfringens* tipo B, C). *C. perfringens* tipo A produce de forma relativamente esporádica procesos digestivos caracterizados principalmente por una abomasitis hemorrágica y ulcerativa. Autor: Exopol.

### Toxinotipos de *Clostridium perfringens*

El número de toxinas producidas por *Cl. perfringens* es elevado (al menos una docena), pero la clasificación en tipos toxigénicos se hace en base a la producción de las toxinas mayores: alfa, beta, épsilon e iota (**Cuadro II**).

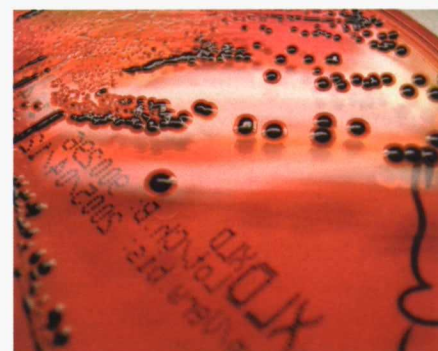
En el diagnóstico de *Clostridium*, el examen anatomopatológico y la anamnesis en campo son muy importantes, siendo con frecuencia el único método utilizado para el diagnóstico de las enterotoxemias. El diagnóstico definitivo requiere la confirmación laboratorial de un elevado recuento de *Cl. perfringens* en contenido intestinal y, con mayor utilidad aún, de la presencia de toxinas en dicho intestino o en las heces.

**Cuadro II. Clasificación de toxinotipos de *Cl. perfringens***

Toxinotipos <i>Cl. perfringens</i>	Toxinas mayores			
	alfa	beta	épsilon	iota
Tipo A	++			
Tipo B	+	++	+	
Tipo C	+	++		
Tipo D	+		++	
Tipo E	+			++



**Foto 12.** Huevos de nematodos: *Strongyloides* (larvados) y Trichostrongylidos (blastómeros, no larvados) observados en un estudio coprológico a partir de heces bovinas. Se realizó una técnica de flotación con sulfato de zinc. Observación en microscopía de campo claro x400 en fresco. Autor: Exopol.



**Foto 13.** Cepa de *Salmonella spp* en agar XLD tras 24 horas de incubación a 37 °C. Las colonias presentan color negro en su interior debido a la producción de H<sub>2</sub>S. Autor: Exopol.

**“ La toma de muestras debe estar orientada por cada laboratorio ya que no todos cubren todas las posibilidades ”**

fermos con síntomas iniciales, no tratados, y con menos de 24 horas desde la presentación del cuadro clínico. Obviamente esto es difícil de entrada porque supone sacrificar animales que pueden tratarse. De animales muertos también se puede obtener mucha información, pero los resultados son más difíciles de interpretar por la proliferación bacteriana *post mortem*. En todos los casos, los órganos deben enviarse refrigerados y en bolsas individuales.

En el laboratorio, el anatomopatólogo puede valorar las lesiones de las zonas afectadas y tomar las muestras más adecuadas para su estudio.

En animales vivos se pueden tomar hisopos rectales y/o heces directamente del recto. Además se puede muestrear más animales con síntomas iniciales y sin tratar, y es mucho más económico.

En el caso de que se envíen muestras para histopatología se deben tomar varios fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> fijados con formalina al 10% del colon, ciego, ileon y yeyuno, y por supuesto de las lesiones que puedan aparecer. Hay que asegurarse de que la mucosa está en contacto con la formalina. Si existe necrosis, hay que enviar tejido necrosado y el adyacente sin necrosar. Todas las muestras deben ir perfectamente identificadas.

Las muestras intestinales se estropean con facilidad (autolisan) si no están fijadas, pero a veces es preferible que sea el anatomopatólogo en el laboratorio el que seleccione los trozos a estudiar. ■

Bibliografía en poder de los autores (exopol@exopol.com)