

Los procesos diarreicos son especialmente frecuentes y graves durante el primer mes de vida de los corderos y cabritos, constituyendo uno de los principales factores limitantes de la productividad.

P. RUMIANTES

Diagnóstico de las diarreas neonatales

D. Cid, J.A. Ruiz-Santa-Quiteria, J.A. Orden y R. de la Fuente.
Dpto. Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM.

El Síndrome Diarreico Neonatal es un claro ejemplo de enfermedad compleja o multifactorial. En su presentación y evolución intervienen factores ligados al animal, las condiciones medioambientales y de manejo y diferentes agentes infecciosos causales. Entre los factores ligados al animal podemos destacar la sensibilidad individual y de raza, la edad, la vitalidad del animal al nacer y el nivel de inmunidad calostrual alcanzado.

Múltiples determinantes epidemiológicos ligados al ambiente y al manejo de los animales influyen en la morbilidad y mortalidad de estos procesos en los pequeños rumiantes y muchos de ellos presentan interrelaciones más o menos complejas. La nutrición y el estado inmune de las madres, unas buenas prácticas de higiene y una adecuada toma de calostro son los principales factores de manejo que afectan a la capacidad de supervivencia de los rumiantes neonatos.

En los pequeños rumiantes la importancia relativa de los agentes implicados en las diarreas neonatales se ha investigado mucho menos que en los terneros y, con frecuencia, se ha tendido a considerar que las investigaciones realizadas en los terneros podían extrapolarse a los pequeños rumiantes. Sin embargo, los estudios etiológicos y epidemiológicos realizados por nosotros y otros investigadores en España y los resultados de los

escasos estudios realizados en el resto del mundo no avalan esta visión (Cid *et al.*, 2004).

De acuerdo con los resultados de los estudios antes mencionados, y dejando aparte a *Clostridium perfringens* tipo B, causante de la Disentería de los corderos, por ser una enterotoxemia, los tres enteropatógenos implicados con mayor frecuencia en el Síndrome Diarreico Neonatal de los pequeños rumiantes son: determinadas estirpes patógenas de *E. coli*, rotavirus y *Cryptosporidium*. Las estirpes de *E. coli* que han sido implicadas en la etiología en este tipo de procesos en los corderos y cabritos son las estirpes de *E. coli* productoras de las fimbrias de la familia F17 (*E. coli* F17), estirpes de *E. coli* enteropatógenas (ECEP) y estirpes de *E. coli* enterotoxigénicas (ECET).

En relación con los enteropatógenos asociados con las diarreas neonatales de los rumiantes es preciso resaltar dos hechos. En primer lugar, que todos ellos se detectan tanto en animales diarreicos como sanos, hecho que pone de manifiesto la importancia que los factores asociados al animal, al medio ambiente y el manejo, juegan en la presentación del Síndrome Diarreico. Y en segundo lugar, que son frecuentes las infecciones mixtas tanto en un mismo animal, como en una explotación. En condiciones de campo, las infecciones mixtas se han asociado con cuadros clínicos más graves y con tasas

de mortalidad más elevadas (Cid *et al.*, 2004).

Diagnóstico laboratorial

El diagnóstico laboratorial permite conocer los enteropatógenos presentes en la explotación y su interés radica en orientar las actuaciones futuras como, por ejemplo, implantar un programa de vacunación o introducir cambios en las prácticas higiénicas o de manejo. Hay que tener claro, sin embargo, que el diagnóstico laboratorial ayuda poco a resolver el problema de forma inmediata cuando se presenta en la explotación ya que el tratamiento de los animales afectados, dirigido fundamentalmente a corregir la deshidratación y la posible acidosis, debe hacerse lo antes posible con independencia de la causa. Además, la diarrea neonatal es un problema endémico en las explotaciones con el que el ganadero y el veterinario están acostumbrados a convivir, y con frecuencia sólo se recurre al diagnóstico laboratorial cuando se presentan brotes especialmente graves, con una alta mortalidad y/o persistencia.

El diagnóstico laboratorial de esos procesos está, por tanto, orientado al diagnóstico de la infección en la explotación y debe comprender el análisis de distintos animales, tanto diarreicos como sanos, de tal forma que pueda determinarse la presencia de infecciones mixtas en la explotación, así como las posibles diferencias en la

frecuencia de aislamiento de los distintos enteropatógenos en los diarreicos y sanos.

El diagnóstico de la infección con los principales agentes enteropatógenos implicados en la etiología de la diarrea neonatal debe incluir el diagnóstico virológico, bacteriológico y parasitológico. El diagnóstico se realiza mediante la detección del agente infeccioso, de sus antígenos o de su ácido nucleico en diferentes muestras (**Cuadro I**).

Muestras

Las muestras que se utilizan para el diagnóstico son generalmente heces de animales vivos, pero también

racterizan por expresar las fimbrias F5 y/o F41 y producir la enterotoxina termoestable STa. Dado que, por una parte, se ha demostrado que existe una estrecha correlación entre la expresión de la fimbria F5 y la producción de STa y que, por otra, la detección de la toxina requiere métodos más complejos o caros, en la práctica se recurre a la detección del antígeno F5 como método de detección de las cepas de ECET (Ruíz-Santa-Quiteria *et al.*, 2002).

Los métodos más utilizados para la detección de dicho antígeno son la aglutinación rápida con sueros específicos a partir del cultivo bacteriano y las pruebas ELISA que per-

mite la detección de otros antígenos fimbriales, además del F5, como son el F41 y el F17, utilizando los sueros específicos frente a dichos antígenos.

Existen varias pruebas ELISA comerciales para el diagnóstico simultáneo de la infección con varios enteropatógenos directamente en heces que basan la detección de las estirpes de ECET en la detección del antígeno F5. También existen pruebas ELISA comerciales para la detección de la toxina termoestable STa a partir del cultivo de las bacterias en medios adecuados para su producción, pero que resultan caros y son innecesarios en el diagnóstico rutinario, debido a la correlación entre la presencia del antígeno F5 y la enterotoxina.

En los últimos años se han diseñado pruebas de PCR múltiple que permiten la detección simultánea de las fimbrias F5 y F41 y de la toxina STa. Estas pruebas son altamente sensibles y específicas y muestran una buena concordancia con las pruebas ELISA antes descritas (Ruíz-Santa-Quiteria *et al.*, 2002).

La aplicación de las distintas técnicas de diagnóstico a la detección de la infección con ECET en pequeños rumiantes nos ha permitido demostrar que, en contra de la creencia general, las estirpes de ECET tienen una participación muy baja o prácticamente nula en la etiología de las diarreas neonatales de los pequeños rumiantes (Cid *et al.*, 1993; Orden *et al.*, 2002). De ahí la importancia de incluir en el diagnóstico laboratorial otras estirpes de *E. coli* asociadas a la diarrea en los rumiantes que pueden tener un papel mucho más relevante que las estirpes de ECET.

***E. coli* F17**

El diagnóstico de estas estirpes se basa en la detección del antígeno fimbrial F17. Esta puede realizarse, al igual que la detección de las fimbrias F5 y F41, por aglutinación rápida con sueros específicos a partir del cultivo bacte-

CUADRO I. Técnicas de diagnóstico de la infección con los principales enteropatógenos implicados en las diarreas neonatales de los pequeños rumiantes.

	Detección de		
	Agente infeccioso	Antígenos	Acido nucleico
<i>E. coli</i> enterotoxigénico (ECET)		Aglutinación rápida (Ag F5 y/o F41) ELISA (Ag F5, STa)	PCR
<i>E. coli</i> F17		Aglutinación rápida (Ag F17)	PCR
<i>E. coli</i> enteropatógeno (ECEP)	Microscopía electrónica (lesión de adhesión y borrado en cortes intestinales)		PCR
Rotavirus	Microscopía electrónica	Inmunomicroscopía electrónica Inmunofluorescencia en cortes intestinales Aglutinación con látex ELISA	Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) PCR
<i>Cryptosporidium</i>	Microscopía óptica (observación de ooquistes)	Inmunofluorescencia en cortes intestinales y en heces ELISA	PCR

puede utilizarse contenido intestinal de animales muertos o sacrificados y tejido intestinal recogido en la necropsia.

Las muestras deben recogerse de animales no tratados, directamente del recto y lo más pronto posible desde el comienzo de la diarrea (como máximo 48 horas). Algunos de los enteropatógenos producen una infección autolimitante y dejan de eliminarse antes de que cesen los síntomas. Deben enviarse muestras de varios animales diarreicos y de algunos no afectados por el proceso de similar edad. Si no van a enviarse inmediatamente al laboratorio, deben refrigerarse.

***E. coli* enterotoxigénico (ECET)**

Las estirpes de ECET que afectan a los rumiantes se ca-

miten la detección del antígeno directamente a partir de las heces.

El método de aglutinación requiere previamente el cultivo bacteriano. Para el aislamiento de las bacterias a partir de las heces se utilizan medios selectivos de enterobacterias (McConkey). A partir de este medio se seleccionan varias colonias al azar para realizar la detección de los antígenos fimbriales. Esta técnica aumenta la sensibilidad del método, puesto que en el cultivo primario pueden crecer distintas estirpes de *Escherichia coli* que pueden tener o no distintas características culturales. Las colonias seleccionadas se resiembran en medios específicos para la expresión de los antígenos fimbriales (Minca-IsoVitallex). Este método tiene la ventaja

riano en medios que favorecen su expresión, como se indicó en el apartado anterior. También se han descrito técnicas de PCR para la detección de los genes que codifican dichos antígenos fimbriales que permiten además distinguir los distintos subtipos (Cid *et al.*, 1999).

Según nuestros estudios, estas estirpes son las que se aíslan con mayor frecuencia de los corderos y cabritos diarreicos en nuestro país (Cid *et al.*, 1993). La mayoría de las cepas de *E. coli* F17 aisladas de corderos y cabritos diarreicos producen el tipo de fimbria F17c y son cepas no enterotoxigénicas que poseen además otros factores relacionados con su capacidad de producir diarrea y/o septicemia (Cid *et al.*, 1999).

***E. coli* enteropatógeno (ECEP)**

Estas estirpes de *E. coli* producen en el intestino una lesión histológica característica, denominada de adhesión y borrado, que consiste en la íntima unión de las bacterias al enterocito (adhesión) provocando la desorganización del citoesqueleto en la zona subyacente al lugar de unión y la destrucción de las microvellosidades (borrado), y finalmente la destrucción y muerte celular (Cid *et al.*, 2004).

En principio, sólo era posible el diagnóstico de estas estirpes, por la detección de la lesión histopatológica característica por microscopía óptica y electrónica a partir de cortes de tejido intestinal. En la actualidad, se han desarrollado distintas técnicas de PCR que se basan en la detección del gen *eae*, que codifica la proteína responsable de la íntima unión de las bacterias a los enterocitos, denominada intimina. Estas técnicas permiten además distinguir los distintos subtipos del gen (Cid *et al.*, 2001, Orden *et al.*, 2003). Hasta el momento, se han descrito al menos 11 subtipos del gen denominados con las letras del alfabeto griego y algunas variantes de estos subtipos en base a variaciones antigénicas y al análisis del gen por PCR y secuenciación

(Adu-Bobie *et al.*, 1998; Cid *et al.*, 2001). Las estirpes de ECEP asociados a la diarrea en los pequeños rumiantes, al igual en los terneros, producen el tipo de intimina P y pertenecen mayoritariamente al serogrupo O26 (Cid *et al.*, 2001; Orden *et al.*, 2003).

Algunas de las estirpes de *E. coli* productoras de la lesión de adhesión y borrado asociadas a los procesos diarreicos en distintas especies animales y en el hombre producen además verotoxinas (Orden *et al.*, 1998). Para la detección de las verotoxinas pueden utilizarse ensayos de citotoxicidad en cultivo celular, pruebas ELISA y técnicas de PCR. No obstante, los estudios epidemiológicos realizados por nosotros muestran que en los pequeños rumiantes la mayoría de las cepas productoras de la lesión de adhesión y borrado, no producen verotoxinas a diferencia de las aisladas de terneros, en los que ambos grupos de cepas se han asociado a la producción de diarrea (Cid *et al.*, 2001; de la Fuente *et al.*, 2002; Orden *et al.*, 2003). Por tanto, no es necesario incluir la detección de dichas toxinas en una fase inicial del diagnóstico rutinario de las diarreas neonatales de pequeños rumiantes.

Rotavirus

Los rotavirus se clasifican en siete grupos denominados por letras mayúsculas de la A a la G, y los virus de cada grupo comparten antígenos. Los rotavirus del grupo A son los más frecuentes en los animales y en el hombre y los más estudiados (Saif *et al.*, 1994). Los rotavirus del resto de los grupos se denominan rotavirus atípicos y no son detectados en las pruebas basadas en la detección de antígenos virales del grupo A puesto que no dan reacciones cruzadas.

Son múltiples las pruebas diagnósticas que se han utilizado para la detección de los rotavirus. Entre las que detectan partículas víricas o sus antígenos cabe destacar la microscopía electrónica, la inmunomicroscopía electrónica, la inmunofluorescencia en

cortes intestinales, las pruebas ELISA, la aglutinación con látex y las técnicas de PCR.

La microscopía electrónica fue uno de los primeros métodos usados y aún sigue siendo considerada por algunos autores como la técnica de referencia por su sensibilidad y especificidad. No obstante, por el equipamiento necesario no es una técnica de diagnóstico rutinaria.

Las pruebas ELISA comenzaron a desarrollarse cuando se consiguió replicar los rotavirus del grupo A en cultivos celulares, lo que permitió purificar el antígeno común de grupo y producir anticuerpos frente al mismo. Los ELISA diseñados para la detección de los rotavirus humanos detectan también los rotavirus de origen animal puesto que se basan en la detección de determinantes antigénicos específicos de grupo y, de hecho, han sido ampliamente utilizados para la detección de los rotavirus bovinos (Macs *et al.*, 2003). Las pruebas ELISA son fáciles de realizar, rápidas, permiten procesar bastantes muestras simultáneamente y no requieren personal especializado. Existen en el mercado varias pruebas ELISA para la detección de los rotavirus humanos y animales del grupo A. Por otra parte, al estar basados en la detección de los antígenos de grupo, estas pruebas no detectan los rotavirus atípicos.

Las técnicas de aglutinación con látex, de las que existen varias comercializadas, se han desarrollado básicamente para la detección de rotavirus del grupo A en la especie humana, si bien, al estar basadas al igual que los ELISA en la detección del antígeno común de grupo, son aplicables a la detección de los rotavirus del grupo A de origen animal. Las técnicas de aglutinación con látex son más rápidas y fáciles de realizar que los ELISA y algunos estudios muestran que son comparables en eficacia a las pruebas ELISA (Al-Yousif *et al.*, 2001).

Para la detección del ARN vírico se utilizan la electroforesis en gel de poliacrilamida

La nutrición y el estado inmune de las madres, unas buenas prácticas de higiene y una adecuada toma de calostro son los principales factores de manejo que afectan a la capacidad de supervivencia de los rumiantes neonatos

Los tres enteropatógenos implicados con mayor frecuencia en el Síndrome Diarreico Neonatal de los pequeños rumiantes son: determinadas estirpes patógenas de *E. coli*, rotavirus y *Cryptosporidium*

(PAGE) y las técnicas de PCR. Las PAGE se basan en la identificación del patrón característico de migración del ARN de los rotavirus. Permite detectar y diferenciar los distintos grupos de rotavirus, puesto que los rotavirus de cada grupo presentan un patrón electroforético característico común. Esta técnica es comparable en eficacia a la microscopía electrónica y a las pruebas ELISA (Theil, 1990). También se han desarrollado técnicas de PCR que permiten la identificación de serogrupos y serotipos de rotavirus en distintas especies (Chinsangan et al., 1993).

A diferencia de lo que ocurre en los terneros diarreicos en los que los rotavirus son, junto con *Cryptosporidium*, los enteropatógenos detectados con mayor frecuencia (de la Fuente et al, 1998), las frecuencias de detección de rotavirus en corderos y cabritos diarreicos son bajas o muy bajas y raramente sobrepasan el 10% (Muñoz et al., 1996; Cid et al., 2004). A pesar de ello, los rotavirus deben incluirse en el diagnóstico rutinario de las diarreas neonatales para poder elaborar adecuados programas de control de estos procesos en los pequeños rumiantes.

Cryptosporidium

El diagnóstico de la infección por *Cryptosporidium* se realiza básicamente mediante la detección de los ooquistes del parásito o de sus antígenos en las heces. Entre las técnicas utilizadas hay que destacar la observación microscópica directa de extensiones de las heces teñidas con diferentes métodos, la inmunofluorescencia directa y las pruebas ELISA (Kehl et al, 1995).

Las tinciones más utilizadas para la identificación de ooquistes son la tinción de Ziehl-Nielsen modificada (ZNM) y la tinción negativa de Heine. Ambas permiten identificar fácilmente los ooquistes en extensiones fecales y diferenciarlos de otros organismos presentes en las heces como las levaduras. La técnica de Heine pese a ser más rápi-

da y tener una sensibilidad similar a la de ZNM, tiene el inconveniente de que los ooquistes pierden progresivamente sus características tinctoriales y, en consecuencia, la observación microscópica de la preparación debe realizarse inmediatamente después de la tinción.

Los distintos ELISA desarrollados para la detección de *Cryptosporidium* que están siendo comercializados permiten analizar gran número de muestras simultáneamente, son fáciles de realizar y de interpretar y muestran una sensibilidad y especificidad adecuadas, aunque presentan limitaciones a la hora de detectar cargas parasitarias bajas (Newman et al., 1993; Rosenblatt y Sloan, 1993). También existen en el mercado algunas pruebas rápidas para la detección de ooquistes en las heces basadas en la detección de antígenos específicos de *Cryptosporidium* que han sido desarrolladas para el diagnóstico de la infección en el hombre y que han demostrado ser útiles también para la detección de ooquistes en las heces de terneros (Muccio et al., 2004).

En los últimos años también se han desarrollado distintas pruebas de PCR para la detección y tipificación de *Cryptosporidium* (Tanriverdi et al., 2002).

Desde que se confirmó el papel de *Cryptosporidium spp* como agente primario en la etiología de la diarrea neonatal de los corderos, en los años 80, en estudios experimentales, la infección con este enteropatógeno ha adquirido una importancia creciente en la etiología de estos procesos (De Graaf et al, 1999). La infección con *Cryptosporidium spp* se asocia con mayores tasas de mortalidad y, dependiendo de las condiciones ambientales y la presencia de otros enteropatógenos, de morbilidad de los procesos diarreicos en los corderos y cabritos recién nacidos.

Salmonella

La detección de *Salmonella* se realiza por aislamiento a

partir de heces. Clásicamente se realizan cultivos de enriquecimiento en caldos selectivos (selenito y tetracionato) durante 24 horas y después se siembran medios selectivos de *Salmonella* como el Verde Brillante y se incuban otras 24 horas. Después de la identificación bioquímica, las cepas se analizan por aglutinación con sueros polivalentes comerciales. La serotipificación de las cepas se realiza en centros de referencia.

Diagnóstico rápido

En el diagnóstico de las diarreas neonatales de los rumiantes, suelen utilizarse las pruebas ELISA comerciales que permiten la detección simultánea de los cuatro enteropatógenos más frecuentes en la etiología de estos procesos en los terneros: *Cryptosporidium*, rotavirus, coronavirus y ECET. Estas pruebas se basan en la detección de determinados antígenos de estos agentes infecciosos directamente en las heces. Es un método rápido que permite procesar simultáneamente gran número de muestras y que aporta información global de las infecciones presentes en una determinada explotación.

Este método de diagnóstico rápido es especialmente válido en el caso la diarrea neonatal de los terneros. Sin embargo, en los pequeños rumiantes la participación de los ECET es prácticamente nula, como ya se indicó, y es más interesante el diagnóstico de otras estirpes patógenas de *E. coli* que no detectan estas pruebas.

Puede utilizarse esta técnica combinada con la detección de ECEP y *E. coli* F17, a partir del cultivo bacteriano. Tanto en terneros como en corderos y cabritos es también interesante realizar el diagnóstico rutinario de *Salmonella* por las posibles implicaciones que para la salud pública pueda tener. ●

La bibliografía citada se encuentra en la redacción a disposición de los lectores interesados.