

Diagnóstico en rumiantes

Toma de muestras de respiratorio

En casi todos los casos, los problemas respiratorios son una enfermedad multifactorial. Para llevar a cabo un diagnóstico correcto es preciso recordar que es el veterinario que conoce la explotación y puede ponderar todos los datos quien hace el diagnóstico final, aunque el laboratorio oriente y aconseje. En este trabajo se explica cómo realizar la toma de muestras en procesos respiratorios y se comentan algunos de los resultados que se pueden obtener.

Dra. Elena Gracia Curras, Dra. Ana Belén Fernández, Dr. Bernardino Moreno, Dra. Gema Chacón, Iñaki Albizu, Dr. Rafael Baselga.
Exopol. Autovacunas y Diagnóstico.
San Mateo de Gállego (Zaragoza)
exopol@exopol.com
Imágenes cedidas por los autores

Para controlar los problemas respiratorios hace falta conocer la etiología de los mismos, lo que permitirá modificar el manejo, los programas vacunales (con vacunas y/o autovacunas) o el tratamiento. Normalmente podemos hacer un diagnóstico presuntivo de la etiología de los problemas a partir de los signos clínicos, la edad y el origen de los animales, la situación vacunal, la epidemiología del proceso, los datos de la necropsia y, fundamentalmente, el historial de la granja, ya que los problemas respiratorios tienden a repetirse dentro de una explotación. Sin embargo, nuestra experiencia nos dice que en rumiantes el diagnóstico en campo es difícil, y que una gran mayoría de los aciertos corresponden a que determinados patógenos tienen una incidencia mayor en algunas edades.

En casi todos los casos los problemas respiratorios son una enfermedad multifactorial, ya que normalmente no podemos hablar de una sola causa o un solo patógeno. Además existen grandes variaciones en los síntomas clínicos produci-

dos por un mismo patógeno, en la edad de aparición de los primeros síntomas, debidos fundamentalmente a las diferencias en el estado inmunitario de los animales y al manejo de las explotaciones, y podemos encontrar patógenos normalmente asociados con adultos en animales jóvenes y a la inversa. Por otro lado, es normal identificar simultáneamente varios patógenos, o que unos agentes enmascaren a otros (por ejemplo, los virus por bacterias). Considerándolo todo, para realizar un diagnóstico correcto tenemos que acudir al laboratorio y recordar que es el veterinario que conoce la explotación y puede ponderar todos los datos quien hace el diagnóstico final, aunque el laboratorio oriente y aconseje. En este trabajo queremos tratar la toma de muestras en procesos respiratorios y comentar algunos de los resultados que se pueden obtener.

Etiología

En corderos y cabritos

Como causas infecciosas aparecen fundamentalmente *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *P. trehalosi*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *M. agalactiae* y *M. arginini*. También podemos encontrar virus PI-3 y Borde, *Chlamydo-phil*a y Fiebre Q, y no es raro aislar *Arca-nobacterium pyogenes* o *Corynebacte-rium pseudotuberculosis*, probablemente como oportunistas.

En terneros

Tenemos que considerar a *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* y los virus BVD, PI-3, IBR y especialmente el BRSV. Además, hay que considerar *Haemophilus som-nus*, aunque por nuestra experiencia en España es muy poco prevalente. Los coronavirus respiratorios y las neumonías por *Chlamydo-phil*a tampoco se estudian habitualmente a pesar de que sí parecen ser importantes.

En rumiantes, el diagnóstico de patologías respiratorias en campo es difícil, y una gran mayoría de los aciertos corresponden a que determinados patógenos tienen una incidencia mayor en algunas edades.

En rumiantes, en general, nadie discute el papel de *M. haemolytica* y la evidencia también parece clara para las pastere-las, aunque *P. trehalosi* sea poco frecuen-te. Sin embargo, a pesar del importante papel que se atribuye a *Mycoplasma bovis* y a los virus en terneros, en peque-ños rumiantes no queda clara la impor-tancia de estos patógenos.

Reposición

Como norma, los animales de reposición están adquiriendo inmunidad frente a los patógenos propios de la explotación y aunque en el laboratorio se sigue evidenciando la presencia de virus y micoplas-mas, generalmente éstos no producen patología clínica en estos animales. De hecho, es frecuente que las lesiones pul-monares por micoplasmas desaparezcan en estos animales. Por el contrario, aun-que también se van haciendo resistentes a *Mannheimia* y *Pasteurella*, éstos son los patógenos más frecuentes, y es normal aislar bacterias más normales en proble-mas crónicos de animales adultos como *C. pseudotuberculosis* o *A. pyogenes*. En algunas explotaciones encontramos parásitos pulmonares cuando las pautas de desparasitación no son correctas.

Adultos

En animales adultos las pastere-las y manheimias claramente han dejado de ser un problema, aunque ocasionalmente se aíslan. En pequeños rumiantes apare-cen problemas de curso crónico como adenomatosis, lentivirus (Visna/CAE), tuberculosis (en caprino), pseudotuber-culosis (*C. pseudotuberculosis*), neumo-nías verminosas, y abscesos por *A. pyo-genes*. Estos últimos se consideran pató-genos oportunistas que a través de heri-das producen septicemias, acabando fre-cuentemente en el pulmón. Sin embargo en nuestra experiencia existen rebaños



Pulmón ovino con lesiones de neumonía atípica. Se observan lóbulos apicales y medios con importante consolidación de color roja. Por cultivo bacteriológico se aisló *Mannheimia haemolytica* y *Mycoplasma spp*.



Cepa de *Mycoplasma spp* en agar Hayflick. Procede de un pulmón ovino con neumonía atípica. Morfología típica en "huevo frito", con un centro elevado respecto al resto de la colonia, en la imagen de color más claro.



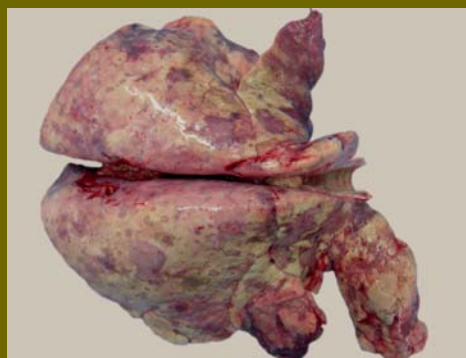
Cepa de *Mannheimia haemolytica* en agar sangre tras 24 horas de incubación a 37°C. Las colonias, de aspecto mucoso, presentan hemólisis tipo beta.



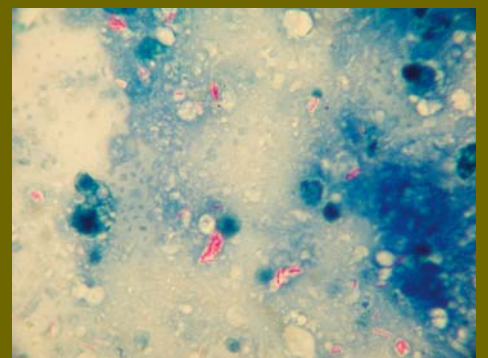
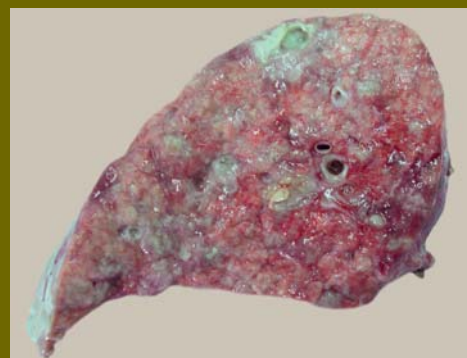
Abscesos múltiples en pulmón de ovino adulto repartidos por todo el órgano. Adherencias entre lóbulos pulmonares. Mediante cultivo se aisló *Corynebacterium pseudotuberculosis*.



Cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en agar sangre incubado 48h a 37°C en aerobiosis. Aislado en ovino. Las colonias son blancas, de aspecto seco, que se fragmenta al retirarlas y con beta hemólisis justo debajo de la colonia.



Pulmón de cabra con tuberculosis. Zonas irregulares de consolidación que a la sección presentaban cavernas con material purulento/caseoso. Los ganglios bronquiales y mediastínicos presentaban amplias zonas de necrosis. Microscópicamente, las lesiones se correspondían con una neumonía y linfadenitis granulomatosas con necrosis y células gigantes características de tuberculosis. Asimismo, se observan zonas de consolidación marronácea en áreas craneoventrales de las que se aisló *Pasteurella multocida*.



Tinción de Ziehl Neelsen con multitud de bacilos ácido alcohol resistentes teñidos de color rojo-fucsia sobre fondo verde. Se identificaron por inmunoperoxidasa como *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Tinción sobre mucosa de la válvula ileocecal de bovino adulto.

con criterios de limpieza correctos que tienen una alta morbilidad por estos patógenos. En bovino, es relativamente frecuente encontrar tuberculosis y nematodos pulmonares.

En las *tablas 1, 2 y 3* presentamos los resultados encontrados en nuestro laboratorio (25.600 casos 2000-2004) aunque no los hemos separado por edad. Se han empleado diferentes técnicas, y los resultados microbiológicos son bajos por la gran cantidad de muestras que llegan contaminadas. Tampoco se incluyen aquellos procesos diagnosticados por otras técnicas como la adenomatosis, tuberculosis o parasitosis. Estos resultados no son una prevalencia ya que el muestreo está sesgado por las analíticas requeridas por el veterinario y por la cantidad de muestras estudiadas en cada caso, en ocasiones insuficientes o en mal estado. Además, el resultado sólo evidencia la presencia de un patógeno y no necesariamente que el patógeno identificado sea el responsable del cuadro clínico.

Toma de datos

Siempre deberíamos tomar los datos clínicos de cualquier proceso para comparar los resultados del laboratorio con las características observadas, el resultado del tratamiento, los cambios de manejo y la evolución en el tiempo. Un archivo escrito y documentado siempre es mucho más útil que la simple memoria.

Técnicas diagnósticas

La toma de muestras la debe orientar el laboratorio porque ninguno cubre todas las posibilidades, ni emplea necesariamente las mismas técnicas. Se han puesto a punto y se han publicado muchas técnicas diferentes para muchos patógenos; sin embargo, la gran mayoría no son comerciales. Por ejemplo, muchos PCR se realizan a partir de cebadores preparados en el mismo laboratorio. Existen varias técnicas habitualmente disponibles para los patógenos implicados en procesos respiratorios de rumiantes.



Tumor intranasal ovino. Se diagnosticaron dos casos en la misma explotación.

En las técnicas directas aislamos o identificamos el patógeno o alguno de sus componentes. En las indirectas detectamos la respuesta (celular o humoral, anticuerpos) del organismo frente al patógeno. Las técnicas directas comprenden el cultivo microbiológico, la identificación morfológica de los parásitos, el inmunodiagnóstico (inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, etc.), el aislamiento viral y las técnicas de biología molecular, entre las que destaca la PCR. Lógicamente ni el aislamiento viral, ni muchas veces la PCR, son técnicas de rutina.

En problemas respiratorios de pequeños rumiantes los diagnósticos indirectos tienen poco interés porque, a diferencia de otras especies, no existen técnicas comerciales. En bovino sí se puede hacer serología frente a los virus y podemos emplear tanto los perfiles serológicos como los sueros pareados para el diagnóstico. Aunque sólo en el caso del BVD y con algunas vacunas en IBR podemos distinguir respuestas vacunales y de infección.

Toma de muestras

Como en otras especies animales, podemos detectar muchos patógenos en vías respiratorias altas, pero para realmente estar seguros de la etiología del problema tenemos que trabajar con pulmón o con lavados traqueobronquiales.

Como siempre, la mejor muestra serían varios animales enfermos con síntomas agudos, no tratados, y con menos de 24 horas desde la presentación del cuadro. En porcino estamos trabajando con gran éxito con lavados traqueobronquiales introduciendo una sonda por la nariz. En rumiantes, lo más normal es tomar muestras de tejidos tras la necropsia e hisopos traqueales y pulmonares. Por supuesto, de los animales muertos también podemos obtener mucha información aunque es muy frecuente la contaminación (por eso los bajos porcentajes indicados anteriormente). Las muestras de órganos deben enviarse refrigeradas, en bolsas individuales e identificadas. El

gran volumen de los animales muertos enteros hace que sea muy difícil enfriarlos y que se autolisen muy rápidamente, por lo que intentaremos no enviar este tipo de muestras. Lo mismo sucede con los órganos grandes no refrigerados. Para la detección de agentes por técnicas inmunodiagnósticas o PCR, las muestras pueden ser congeladas.

Es importante enviar siempre que sea posible, por su tamaño, el pulmón entero con tráquea y ganglios, ya que los patógenos no se distribuyen uniformemente. Cuando no sea posible hay que enviar fragmentos grandes de distintas zonas del pulmón.

Si no se solicita anatomía patológica, para el análisis de muchos patógenos (bacterias, virus y parásitos) se pueden tomar muestras de los órganos necropsiados con hisopos que, evidentemente, son mucho más fáciles de enviar.

En el caso de que se envíen muestras para histopatología se deben tomar varios fragmentos de pequeño tamaño fijados con formalina al 10% de distintas partes del pulmón y, por supuesto, de las lesiones que puedan aparecer. Si existen lesiones macroscópicas es necesario enviar tejido lesionado de transición y aparentemente sano.

Para el diagnóstico indirecto basado en la detección de anticuerpos es suficiente enviar sangre sin anticoagulante. El suero se puede congelar.

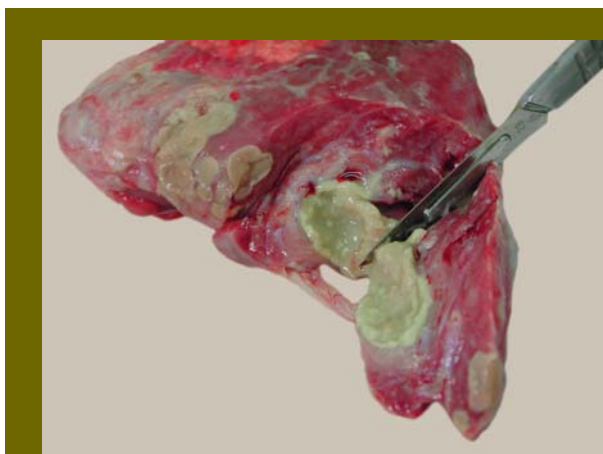
Aunque en la necropsia podemos encontrar los parásitos en los diferentes órganos, para el estudio de éstos las mejores muestras son las heces tomadas del recto de los animales donde se detectan las formas de eliminación. Se deben enviar refrigeradas al laboratorio para impedir que los huevos sigan desarrollándose y pierdan sus características típicas. ●

A la hora de enviar las muestras al laboratorio es importante, siempre que sea posible por su tamaño, mandar el pulmón entero con tráquea y ganglios, ya que los patógenos no se distribuyen uniformemente.

Tabla 1. Muestras de respiratorio en bovino		
Técnica	Positivas	Patógeno (nº casos estudiados)
Inmunoperoxidasa	9%	IBR (381)
	49%	BRSV (365)
	11%	BVD (329)
	8%	PI3 (260)
	41%	<i>M. bovis</i> (246)
	7%	Adenovirus (14)
Cultivo	5%	<i>Pasteurella multocida</i> (889)
	4%	<i>Mannheimia haemolytica</i> (889)
	3%	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (889)
	<1%	<i>Haemophilus somnus</i> (889)

Tabla 2. Muestras de respiratorio en ovino		
Técnica	Positivas	Patógeno (nº casos estudiados)
Inmunoperoxidasa	40%	<i>M. ovipneumoniae</i> (159)
	33%	<i>M. arginini</i> (117)
	12%	PI3 (33)
	10%	Border (30)
	18%	Visna Maedi (11)
Cultivo	13%	<i>Mannheimia haemolytica</i> (973)
	12%	<i>Pasteurella multocida</i> (973)
	6%	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (973)
	4%	<i>Pasteurella trehalosi</i> (973)

Tabla 3. Muestras de respiratorio en caprino		
Técnica	Positivas	Patógeno (nº casos estudiados)
Inmunoperoxidasa	35%	<i>M. ovipneumoniae</i> (51)
	32%	<i>M. arginini</i> (41)
	33%	<i>M. agalactiae</i> (18)
	25%	<i>M. capripneumoniae</i> (12)
Cultivo	14%	<i>Mannheimia haemolytica</i> (552)
	7%	<i>Pasteurella multocida</i> (552)
	4%	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (552)
	4%	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (552)



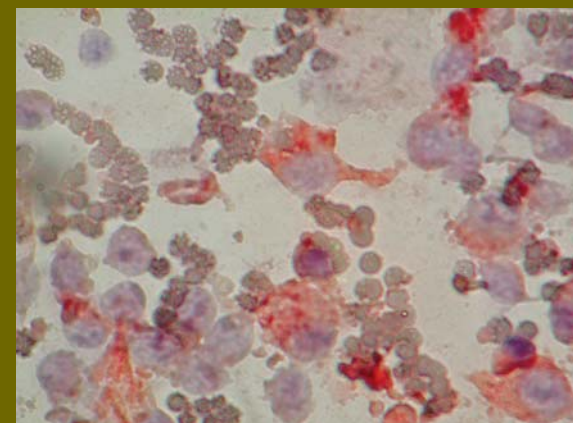
Lóbulos apicales de un pulmón ovino adulto con neumonía fibrino-purulenta. Superficie pulmonar recubierta de una gruesa capa de fibrina. Parénquima pulmonar consolidado, de color rojo intenso y consistencia dura y con abscesos de tamaño variable de tejido necrótico y pus. Se aisló por cultivo bacteriológico *Pasteurella trehalosi* y *Mycoplasma spp.* Resultado negativo a *M. ovipneumoniae* y *M. arginini*.



Pulmón caprino con áreas de diferente coloración y consistencia aumentada. Exudado fibrinoso sobre la superficie pleural. *Mycoplasma capricolum* y *Mycoplasma mycoides mycoides* LC mediante inmunoperoxidasa con anticuerpos policlonales (PHLS London Aarthus Collection). Por cultivo se aisló *Mycoplasma*, *Pasteurella trehalosi* y *Arcanobacterium pyogenes*, posiblemente como oportunista que coloniza lesiones previas. Ejemplo claro de neumonía por causa multifactorial.



Fragmento de pulmón de un bovino de 6 meses de edad. Se observa enfisema generalizado con presencia de bolsas y burbujas de gas bajo la superficie pleural y en los septos lobulillares. Por cultivo bacteriológico no se obtuvo crecimiento. Mediante inmunocitoquímica se detectó BRSV.



BRSV. Células procedentes de un pulmón de un ternero de 4 meses afectado de BRSV (Virus respiratorio sincitial bovino). Marcación mediante inmunoperoxidasa indirecta con un anticuerpo monoclonal que detecta una proteína nuclear de 42-44 kDa (CHEMICON). Sustrato AEC en DMF. Contraste Hematoxilina de Mayer. Observación en campo claro 100X. Las células positivas se ven de color rojizo. El BRSV infecta linfocitos y neumocitos.