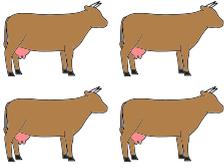


la etiología bovina en
estadísticas
exopol



la etiología bovina en
estadísticas

¿qué muestras debo seleccionar?



analizar **más de un animal** para que los resultados sean representativos del grupo de animales afectados

en nuestros paneles diagnósticos se incluye el análisis de hasta 5 muestras salvo en leche, que puede incluir el análisis de hasta 9



seleccionar **animales con sintomatología clínica al inicio del proceso**: permitirá evaluar los agentes primarios desencadenantes del mismo



enviar muestras **antes de instaurar el tratamiento antibiótico**, ya que este interfiere en los resultados microbiológicos



en caso de mandar **órganos o animales**, es preferible que sean **sacrificados o en su defecto que hayan muerto recientemente**, ya que la autólisis de las muestras afecta en gran medida al éxito diagnóstico

el tipo de muestra se seleccionará en función de:

el tipo de proceso

el agente patógeno a estudiar

la técnica diagnóstica solicitada

el objetivo del análisis: monitorización o diagnóstico

toma de muestras: condiciones y plazos

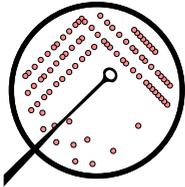
 tº ambiente
  refrigerado
  congelado

		<24h	>24h	observaciones	
	tubos con EDTA		sangre entera	 	congelar solo para estudios de qPCR
	tubos sin anticoagulante		suero	 	no congelar sueros con coágulo
	tubos estériles		leche	 	en casos de mamitis puntuales congelar hasta tener varias muestras
			lavados broncoalveolares	 	la congelación afectará al cultivo microbiológico
			raspados prepuciales	 	
	hisopos con medio		animales vivos o necropsias	 	no congelar los hisopos
	recipientes con cierre hermético		heces	 	la congelación afectará al cultivo microbiológico
			órganos	 	tomar un hisopo (para microbiología) y congelar el órgano (no sirve para histopatología)
	muestras ambientales y de superficies		CORIOLIS (aire)	 	congelar y enviar siempre con acumuladores de frío
			calzas (s. sucias)		
			toallitas (s. limpias)		

cultivo microbiológico

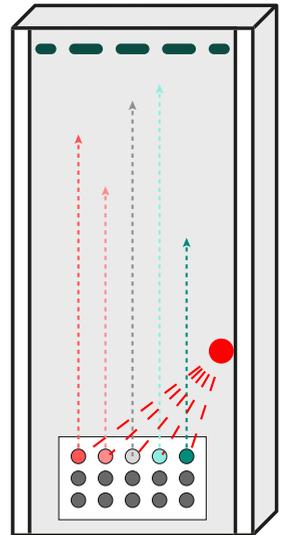
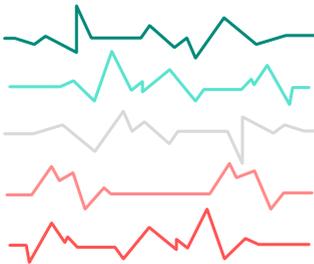
aislamiento e identificación de bacterias por MALDI-TOF

¿en qué consiste?



las **muestras** clínicas son sembradas en el **medio de cultivo** adecuado para conseguir colonias de **cepas bacterianas** de interés clínico

las **colonias** que crecen se identifican con la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF), que permite una **identificación a nivel de género y/o de especie** gracias a la "huella molecular" detectada por esta técnica y que es característica de cada bacteria



hay algunas bacterias cuyo crecimiento es más costoso que el de otras

¿qué bacterias son de difícil crecimiento?

Actinobacillus lignieresii, Actinomyces bovis,
Mycoplasma bovis, Prototheca spp.

antibiogramas

estudio de la sensibilidad antibiótica (técnica Kirby Bauer)

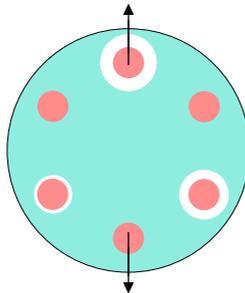
las **cepas bacterianas aisladas** en el cultivo microbiológico pueden sembrarse en el medio de crecimiento apropiado donde se colocan **discos que contienen una concentración estandarizada de antibiótico**

en función del **diámetro del halo** y los **puntos de corte** se determina si la bacteria es sensible o resistente

¿cómo se interpreta?

sensible:

el antibiótico inhibe el crecimiento de la bacteria:
no puede crecer alrededor del disco porque es sensible a él



resistente:

el antibiótico no inhibe el crecimiento de la bacteria:
es capaz de crecer alrededor del disco porque el antibiótico no hace efecto

puedes consultar la lista de

antibióticos que se analizan en bovino

en antibiogramas y en los distintos paneles de CMI
en el apartado de diagnóstico de nuestra web

(www.exopol.com/es/diagnostico)

concentración mínima inhibitoria (CMI)

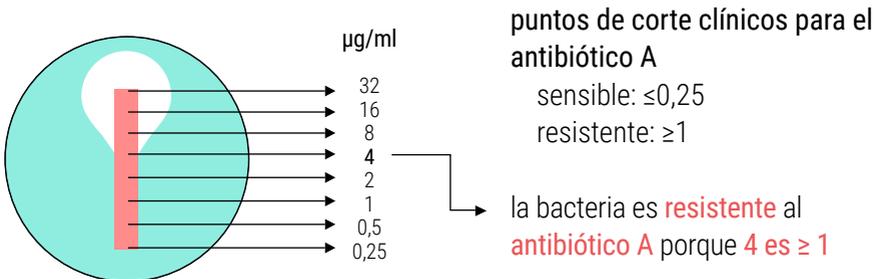
estudio de la sensibilidad antibiótica

mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento de la bacteria

en **exopol** la realizamos por dos métodos distintos:

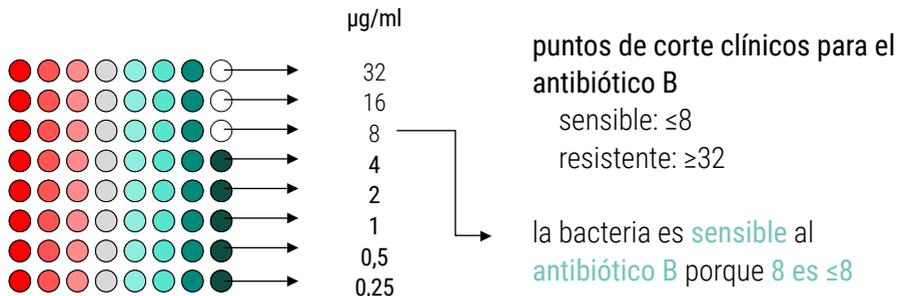
CMI en tira de celulosa (sistema E-test)

la **tira de celulosa tiene un gradiente de antibiótico** que se coloca sobre una **placa de cultivo** donde previamente se ha inoculado la bacteria a estudiar



CMI por microdilución en caldo

se realiza en placas de 96 pocillos donde la bacteria a testar se enfrenta a diferentes concentraciones de antibiótico



clasificación de antibióticos de uso veterinario (EMA)

Categoría D: uso con prudencia

Aminoglucósidos: espectinomicina

Tetraciclinas: clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, minociclina¹

Penicilinas del grupo G y M: cloxacilina, penetamato, bencilpenicilina (G), fenoximetilpenicilina (V)

Sulfamidas, diaminopirimidinas y combinaciones: sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfadoxina, sulfadimidina, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina¹, sulfaquinoxalina, trimetoprima

Aminopenicilinas: amoxicilina, metampicilina, ampicilina

Nitroimidazoles: metronidazol

Polipéptidos cíclicos: bacitracina

Derivados de nitrofurano: nitrofurantoína¹

Antibacterianos esteroideos: ácido fusídico (solo en animales de compañía)

Categoría C: uso con precaución

Aminoglucósidos: neomicina, gentamicina, estreptomycinina, apramicina, frameticina, kanamicina, paromomicina, amikacina¹

Aminopenicilinas combinadas con inhibidores de betalactamasas: amoxicilina-clavulánico

Macrólidos: eritromicina, espiramicina, gamitromicina, tildipirosina, tilmicosina, tilosina, tilvalosina, tulatromicina, azitromicina¹, claritromicina¹

Pleuromutilinas: tiamulina, valnemulina

Lincosamidas: lincomicina, clindamicina, pirlimicina

Antenicoles: florfenicol, tianfenicol, cloranfenicol²

Cefalosporinas (1ª y 2ª generación): cefacetilo, cefadroxilo, cefalexina, cefalonio, cefapirina, cefalotina¹, cefazolina¹

Rifamicinas: rifaximina

Categoría B: uso restringido

Polimixinas: colistina

Quinolonas: enrofloxacino, danofloxacino, difloxacino¹, marbofloxacino, flumequina, pradofloxacino, ciprofloxacino¹

Cefalosporinas (3ª y 4ª generación): cefovecina, cefquinoma, ceftiofur, cefotaxima¹, ceftazidima¹, cefpodoxima¹

Categoría A: evitar

Los antibióticos de esta categoría no están autorizados como medicamentos veterinarios. No deben usarse en animales de producción. Pueden administrarse a animales de compañía en circunstancias excepcionales. Por ejemplo: imipenem, ticarcilina + ácido clavulánico y rifampin.

¹ No autorizado como medicamento veterinario en España.

² Su uso está prohibido en animales productores de alimentos destinados al consumo humano.

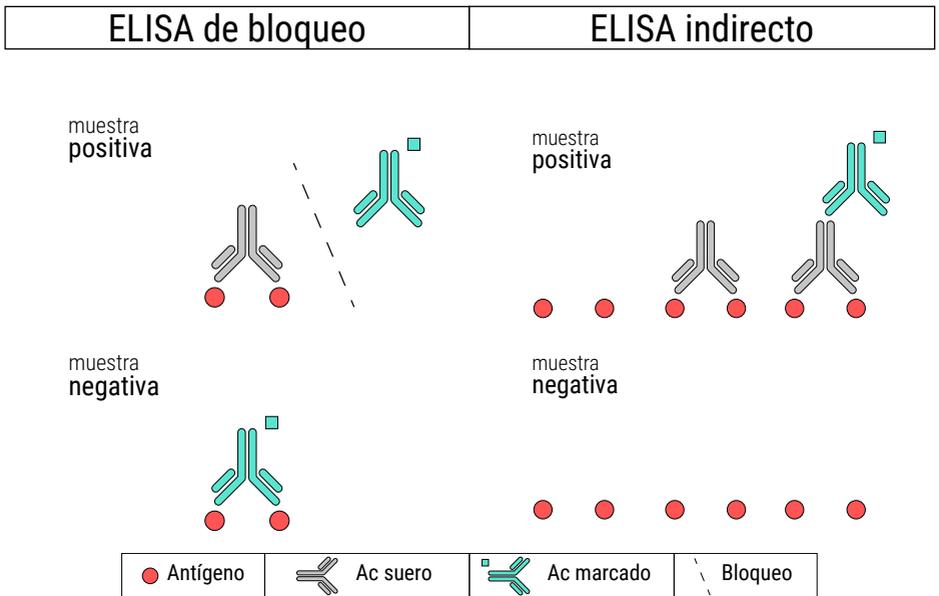
serología

¿en qué consiste?:

detección de anticuerpos generados frente a los patógenos

positivo el animal ha sido vacunado o ha estado infectado

negativo el animal nunca ha estado infectado o no ha seroconvertido



✓ diagnósticos individuales

✗ no es útil para valorar la tasa de anticuerpos a nivel de rebaño

✓ más específico

✓ prevalencia a nivel de explotación

✓ valorar tasa de anticuerpos a nivel de rebaño

✗ posibilidad de falsos positivos si la prevalencia esperada es baja

ELISA tipo DIVA

✓ diferenciación entre anticuerpos por infección de campo y de animales vacunados

Real Time PCR (qPCR)

¿en qué consiste?:

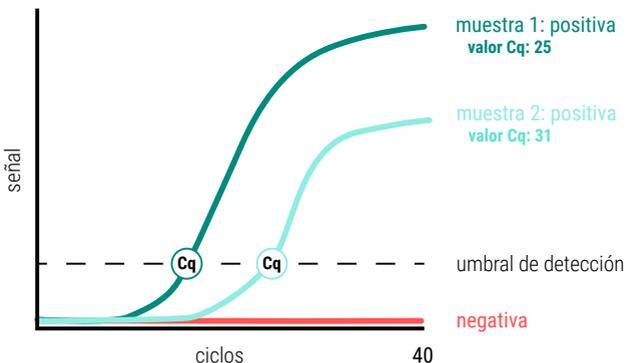
detección de patógenos mediante la amplificación de genes específicos

- positivo** se confirma la presencia del patógeno en la muestra
- negativo** indica la ausencia del patógeno en la muestra o en cantidades por debajo del límite de detección

¿qué ventajas nos da la qPCR?

- ✓ analizar muestras en pool al ser una técnica muy sensible
- ✓ caracterizar y tipificar patógenos, lo que permite diseñar las autovacunas a aplicar o elegir la vacuna que proteja frente a los serotipos identificados
- ✓ diferenciar entre cepas de campo y cepas vacunales
- ✓ realizar estudios epidemiológicos
- ✓ cuantificar: conocer la concentración de patógeno que hay en la muestra gracias al valor Cq*

***Valor Cq:** es el ciclo en el que el número de copias supera el umbral de detección: a menor valor Cq, mayor concentración inicial de patógeno hay en la muestra



secuenciación

¿en qué consiste?:

determinar la secuencia de los nucleótidos de uno o más genes

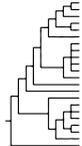
¿qué aplicaciones tiene?

secuenciación (ej. BRSV)

comparamos las secuencias obtenidas con las de cepas vacunales o muestras anteriores secuenciadas

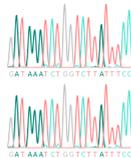


→ generamos árboles filogenéticos



secuenciación + genotipado (ej. Rotavirus A)

comparamos las secuencias obtenidas con las de cepas vacunales o muestras anteriores secuenciadas



→ generamos árboles filogenéticos

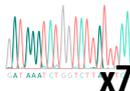


→ obtenemos el genotipo de la cepa



técnica MLST (ej. Mycoplasma bovis)

secuenciamos siete genes

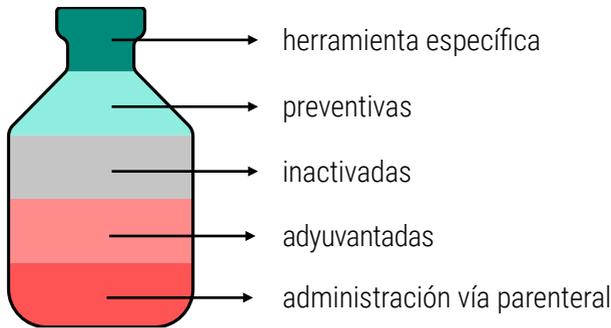


a través de los cambios en las secuencias determinamos los alelos de cada gen: la combinación de los alelos de los 7 genes determinan el ST (tipo de secuencia)

autovacunas

¿qué son?

medicamentos veterinarios inmunológicos fabricados a partir de patógenos aislados de una unidad epidemiológica, inactivados y destinados a la misma



¿cuándo están indicadas?

- ✓ cuando no existe una vacuna veterinaria estándar registrada
- ✓ cuando no existe una vacuna razonablemente eficaz (ej. alta variabilidad antigénica)

¿qué requisitos deben cumplirse?

-  enfermedad infecciosa presente
-  diagnóstico de laboratorio confirmatorio
-  selección de las cepas o serotipos implicados
-  bajo prescripción veterinaria
-  producidas por un laboratorio autorizado (N^º REG Exopol: 235/50/015-A)

son específicas para cada granja

frente a algunos patógenos la vacuna no es efectiva si no contiene los serotipos o variantes antigénicas presentes en la explotación

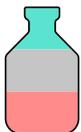
identificamos los **serotipos, factores de virulencia, toxinotipos o secuencias genéticas** específicos de las cepas aisladas en cada caso para incorporar en la autovacuna todas ellas, garantizando así la máxima eficacia de las mismas

un ejemplo:



autovacuna inicial: dos serotipos

→ envío de nuevas muestras para monitorizar la explotación



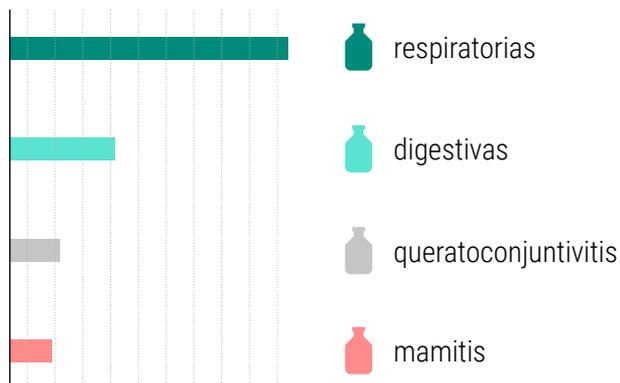
autovacuna final: tres serotipos

autovacunas disponibles en bovino

Actinobacillus lignieresii
Escherichia coli
Clostridium perfringens tipo A
Histophilus somni
Mannheimia haemolytica
Moraxella bovis
Moraxella bovoculi
Mycoplasma bovis
Pasteurella multocida
Salmonella spp.
Staphylococcus spp.
Streptococcus spp.
Trueperella pyogenes

Elaboramos autovacunas específicas para explotación o unidad epidemiológica basadas en el diagnóstico laboratorial y en las que es posible combinar distintos patógenos.

principales autovacunas producidas en 2021:



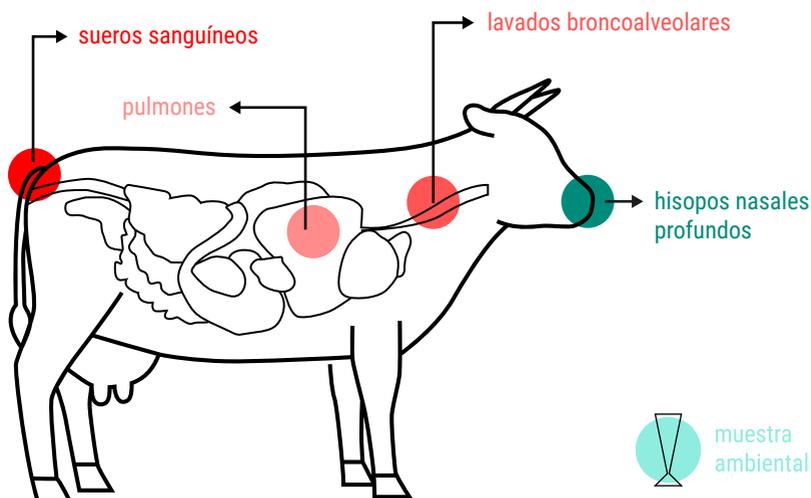
● **resultados estadísticos:**

hemos recopilado los datos obtenidos desde 2016 en nuestro laboratorio para poder ofrecerte estadísticas acerca de la presencia e incidencia de patógenos en los distintos procesos, evolución de la sensibilidad antibiótica en las granjas de la Península Ibérica, qué serotipos están presentes, autovacunas producidas...

- **procesos respiratorios**
- **procesos digestivos**
- **procesos reproductivos**
- **mamitis**
- **otros procesos: hemoparásitos y procesos oculares**

● procesos respiratorios

● toma de muestras



● paneles diagnósticos

Respiratorio:

qPCR: Mycoplasma bovis, Histophilus somni, Pasteurella multocida - Tipado capsular, Mannheimia haemolytica - Identificación serotipos 1, 2 y 6, Pestivirus, IBR, BRSV, Parainfluenza 3, Coronavirus bovino

Respiratorio - Serología:

Serología: BVD p80, IBR gE, Parainfluenza 3, BRSV, Mycoplasma bovis

BRSV - Secuenciación (gene G)

BVD (Bovela) - Diferenciación cepa vacunal:

qPCR: BVDV1 Bovela, BVDV2 Bovela

Mannheimia haemolytica - Identificación de serotipos 1, 2 y 6:

qPCR: serotipos 1, 2 y 6

Pestivirus - Diferenciación:

qPCR: BVDV1, BVDV2, BVDV3 (Hobi-like), Border Disease

Parainfluenza 3 - Secuenciación (gene P)

Pasteurella multocida - Tipado capsular:

qPCR: tipo A, tipo B, tipo D, tipo E, tipo F



Muestrea siempre un número adecuado de animales no tratados y con signos clínicos de aparición reciente.

pulmones

- ✓ permite un diagnóstico completo
- ✓ valoración de problemas respiratorios en vías bajas
- ✗ requiere animales muertos recientemente o sacrificados
- ⚠ puede no ser una muestra representativa del grupo

lavados broncoalveolares/transtraqueales

- ✓ en animales vivos
- ✓ permite muestrear a un mayor número de animales
- ✓ aporta información de los agentes presentes en pulmón
- ⚠ requiere material específico y personal cualificado
- ⚠ técnica más invasiva para el animal (lavados transtraqueales)

hisopos nasales profundos

- ✓ fácil de tomar en animales vivos
- ✓ valoración de problemas respiratorios en vías altas
- ✗ no se toma muestra de pulmón
- ⚠ posibles falsos positivos al detectar bacterias que forman parte del microbioma de las fosas nasales y no alcanzan el pulmón

pero... ¿cuál es la mejor muestra?

Uso de hisopos nasales profundos y lavados broncoalveolares para la detección de patógenos respiratorios

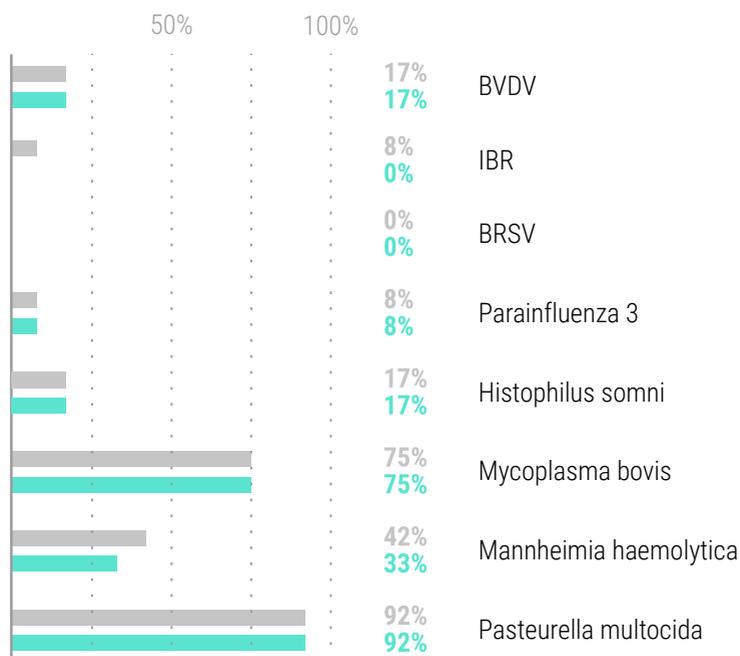
Póster presentado en Anembe 2018

- muestreo pareado (hisopos y lavados) de 5 terneros <1 año provenientes de 12 explotaciones con historial respiratorio

% positivos analizados mediante qPCR

■ pool de hisopos

■ pool de lavados broncoalveolares



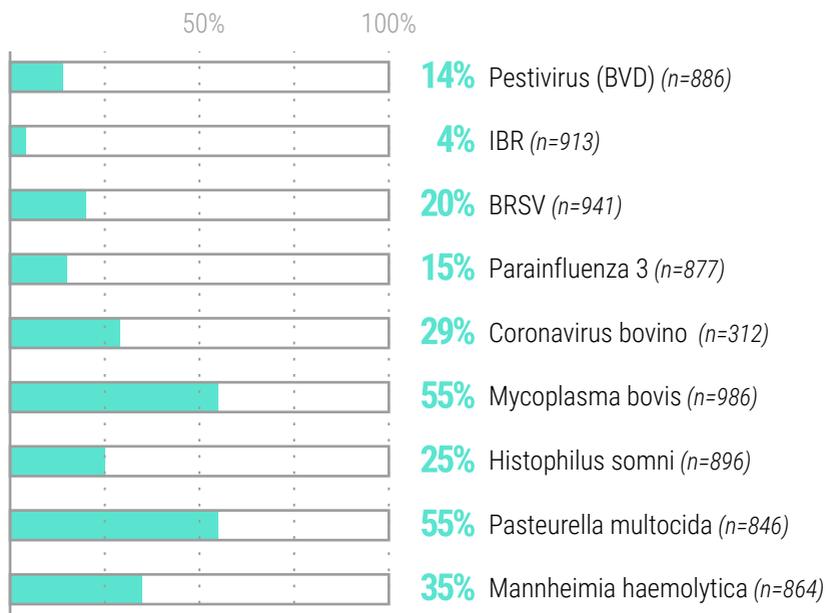
La detección de patógenos es similar en ambos métodos de muestreo, siendo ambos apropiados en animales vivos.

Respecto a IBR, solo se detectó un único caso positivo en el pool de hisopados, siendo negativo el pool de lavados pareado. Esta diferencia observada no es significativa.

● resultados estadísticos: diagnóstico

patógenos analizados en el panel respiratorio

% positivos analizados mediante qPCR



Los agentes detectados con mayor frecuencia son *Mycoplasma bovis* y *Pasteurella multocida*. Dentro de los agentes víricos, los más detectados son el Coronavirus bovino y el virus Sincitial (BRSV).

Las técnicas de PCR detectan las vacunas vivas atenuadas en caso de animales vacunados recientemente. El uso de técnicas de PCR DIVA o secuenciación permite diferenciar cepas vacunales de cepas campo.

Coronavirus bovino es un agente primario de procesos digestivos. Sin embargo, recientemente se está confirmando su implicación en el Complejo Respiratorio, hasta ahora subestimada.

En la mayoría de los casos analizados se trata de complejos respiratorios con presencia de más de un agente implicado.



Coronavirus bovino



Síndrome diarreico neonatal del ternero

síntomas: diarreas líquidas profusas y hemorrágicas, anorexia, deshidratación y frecuentemente muerte



Disentería de invierno en adultos

síntomas: diarreas, descenso producción láctea, depresión, anorexia, descargas nasolacrimales



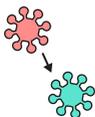
Infecciones respiratorias (terneros > adultos)

síntomas: fiebre, dificultad respiratoria, tos de leve a severa, conjuntivitis

¿qué sabemos sobre ellos?



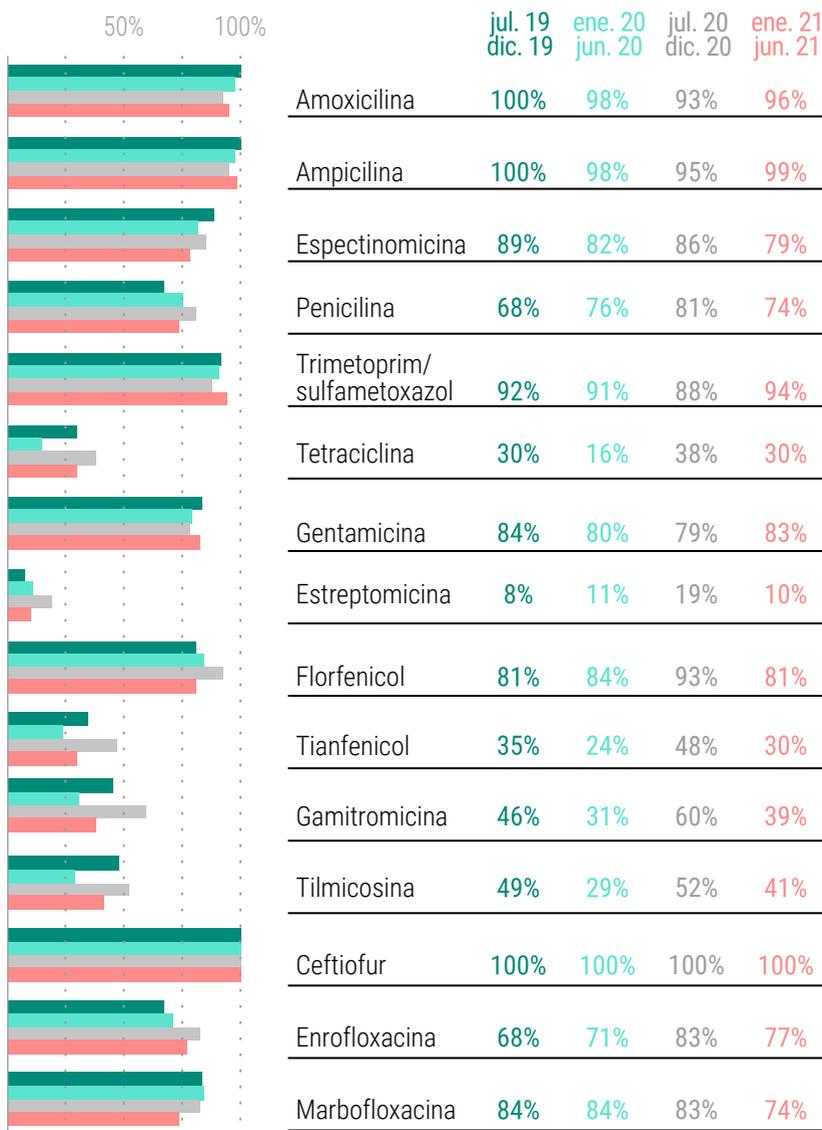
virus entéricos y respiratorios:
protección cruzada descrita aunque existan diferencias genéticas



una infección digestiva puede evolucionar en una infección respiratoria y lesiones de viremia

estudio de la sensibilidad antibiótica (Kirby Bauer) de *Pasteurella multocida*

comparación del porcentaje de sensibilidad de 194 antibiogramas realizados en los siguientes semestres:



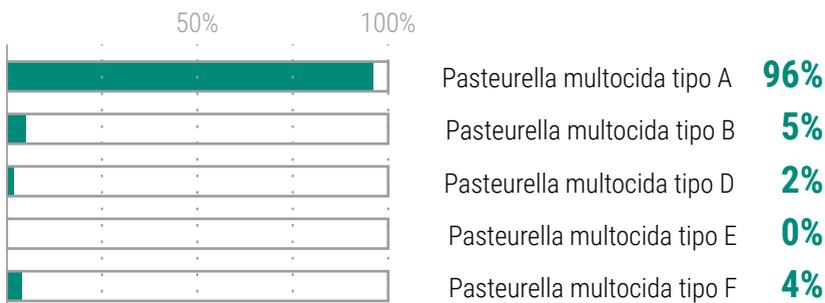
Se ha evaluado la evolución de la sensibilidad de cada antibiótico a lo largo del tiempo mediante la prueba estadística Chi-cuadrado. No se han obtenido diferencias significativas para ningún antibiótico.

Los resultados de sensibilidad de las cepas de *Pasteurella multocida* analizadas muestran que gran parte de ellas son sensibles a la mayoría de antibióticos, excepto a tetraciclina, estreptomicina, tianfenicol y tilmicosina para los que existe una mayor resistencia.

Estas cepas presentan una elevada resistencia a estreptomicina, según la literatura científica hay un aumento de cepas que poseen genes de resistencia a este antibiótico.

detección de tipos capsulares de *Pasteurella multocida* sobre muestra clínica

analizados 189 casos desde julio de 2017 mediante qPCR

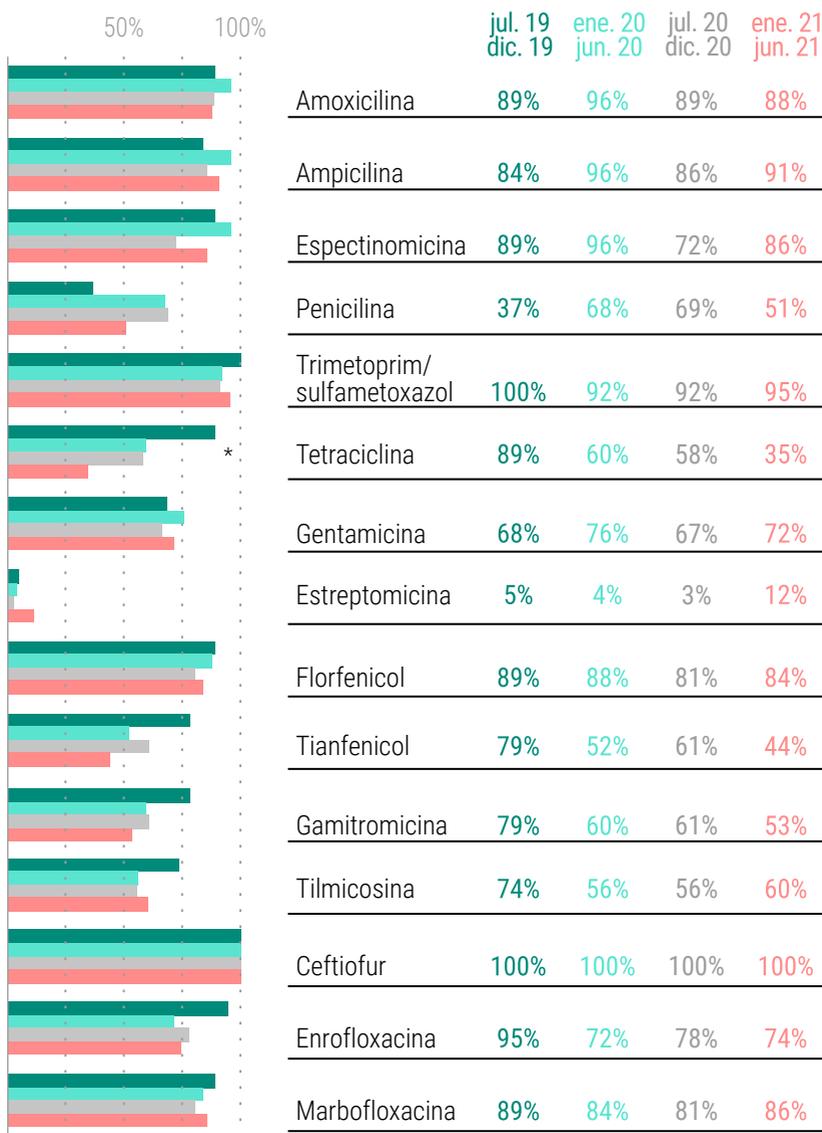


En el 96% de los casos se detectó *Pasteurella multocida* tipo A.

En un 7% de los casos analizados se detectó coinfección del tipo A junto a otro tipo capsular.

estudio de la sensibilidad antibiótica (Kirby Bauer) de *Mannheimia haemolytica*

comparación del porcentaje de sensibilidad de 123 antibiogramas realizados en los siguientes semestres:



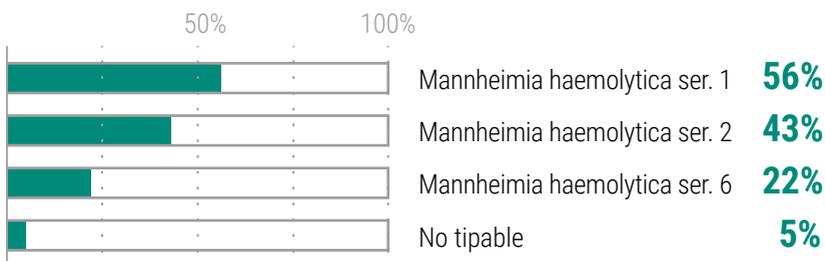
Se ha evaluado la evolución de la sensibilidad de cada antibiótico a lo largo del tiempo mediante la prueba estadística Chi-cuadrado. Se ha considerado que las variables tiempo y sensibilidad son dependientes, es decir, que existen diferencias significativas entre % de sensibles de los diferentes periodos de tiempo, si p -valor $<0,01$ (*).

Los resultados de sensibilidad de las cepas de *Mannheimia haemolytica* analizadas muestran que la mayoría de ellas son sensibles a casi todos los antibióticos testados, aunque se observa una tendencia general de disminución de la sensibilidad antibiótica con el tiempo.

En el caso de la tetraciclina, aparece una disminución estadísticamente significativa de la sensibilidad con el tiempo. Como ocurre con *Pasteurella multocida*, las cepas de *Mannheimia haemolytica* presentan una elevada resistencia a estreptomycin, debido al aumento de la presencia de genes de resistencia a este antibiótico.

detección de tipos capsulares de *Mannheimia haemolytica* sobre muestra clínica

analizados 130 casos desde febrero de 2018 mediante qPCR



Los serotipos más detectados son el serotipo 1 y 2. En el 5% de las muestras clínicas la detección de *Mannheimia haemolytica* es distinta a los serotipos analizados (serotipos 1, 2 y 6).

En el 25% de los casos se encontró una coinfección de dos o tres serotipos detectables de *Mannheimia haemolytica*.

patógenos analizados en el panel serológico respiratorio

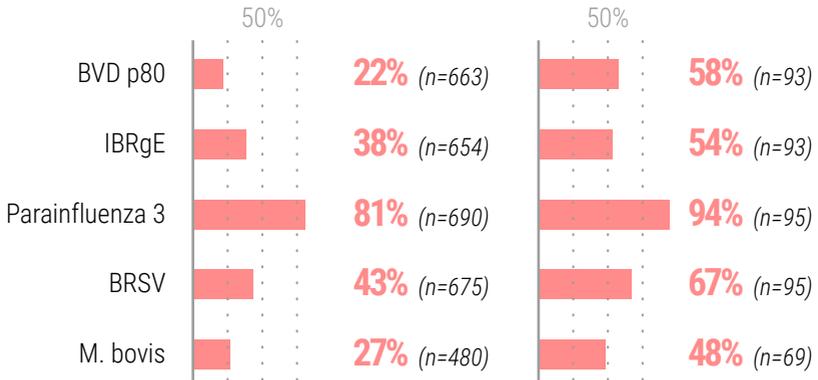
estudio de seropositividad mediante técnicas de ELISA



% sueros positivos
(animales individuales)



% casos positivos



Estos resultados proceden de animales de explotaciones con sintomatología respiratoria y no deben ser tomados como datos de prevalencia. Un resultado positivo puede indicar infección reciente, contacto previo con el agente o presencia de anticuerpos vacunales (en el caso de vacunas no marcadas).

● resultados estadísticos: autovacunas

autovacunas producidas frente a procesos respiratorios

% de autovacunas que incluyen los distintos agentes

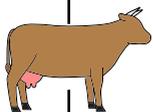


Se elaboran autovacunas específicas para cebaderos de terneros y para granjas de reproductoras. El 100% de las autovacunas elaboradas para terneros de cebo son combinadas de *Mycoplasma bovis* con los distintos serotipos de las Pasteurellaceae aislados.

Las bacterias de las especies *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni*, pertenecen a la familia de las pasterelaceas. Las autovacunas pueden incluir varias cepas de la misma especie o distinta, dependiendo de lo que se haya encontrado en los diagnósticos.



Mycoplasma bovis



responsable de:
neumonía
artritis
mamitis
otitis

✗ **problemas:** incremento de la resistencia a antibióticos

✓ **alternativas:** autovacunas (no existe vacuna comercial)

caracterización de *M. bovis* mediante la técnica MLST

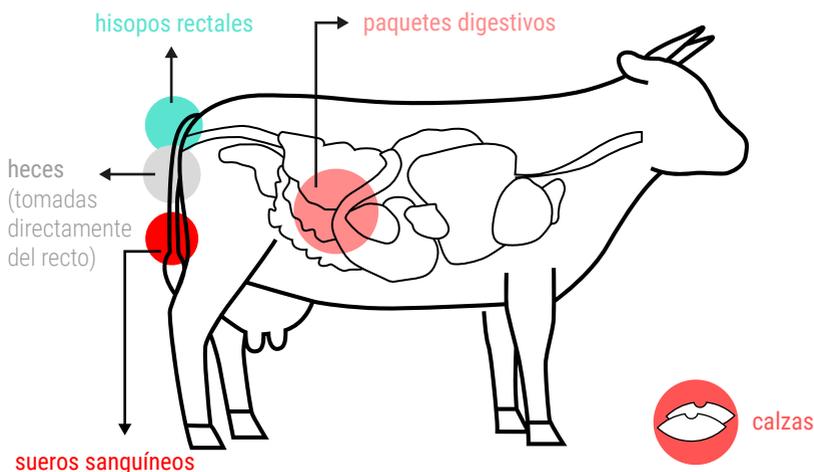
- ✓ detectar cepas presentes en la explotación
- ✓ seleccionar cepas para la realización de autovacunas

estudio preliminar: ST8 y ST122 son las cepas más frecuentemente encontradas en las ganaderías de 



● procesos digestivos

● toma de muestras



● paneles diagnósticos

Digestivo terneros:

qPCR: Escherichia coli - Factores de virulencia, Clostridium perfringens - Toxinotipado, Salmonella sp., Rotavirus tipo A, Coronavirus bovino, Pestivirus, Torovirus bovino, Norovirus genotipo 3, Nebovirus, Cryptosporidium parvum, Eimeria sp.

Coccidios:

qPCR: Eimeria bovis, Eimeria zuernii, Eimeria alabamensis, Eimeria sp.

Coprológico:

qPCR: Eimeria sp., Nemátodos, Céstodos, Tremátodos

BVD (Bovela) - Diferenciación cepa vacunal:

qPCR: BVDV1 Bovela, BVDV2 Bovela

Clostridium perfringens - Toxinotipado:

qPCR: toxinas Alpha, Beta, Epsilon, Iota, Enterotoxina, Beta-2

Escherichia coli - Factores de virulencia:

qPCR: F5, F17, F4, F41, gen eae, STa, STb, LT, STX1, STX2, E. coli

Pestivirus - Diferenciación:

qPCR: BVDV1, BVDV2, BVDV3 (Hobi-like), Border Disease

Salmonelas bovino:

qPCR: S. typhimurium, S. dublin, S. enteritidis, S. infantis

Rotavirus A - Secuenciación (VP7, VP4)



secuenciación de Rotavirus tipo A

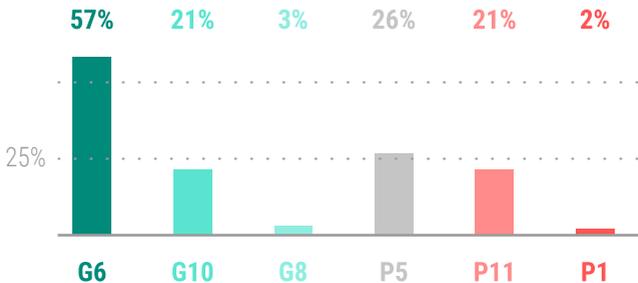
es el virus más frecuentemente detectado en las diarreas neonatales de terneros



gen VP7 (tipo G): al menos 12

gen VP4 (tipo P): al menos 11

genotipos más frecuentes:



combinaciones más frecuentes:



G6P5



G6P11



G10P11

¿qué nos aporta la secuenciación?

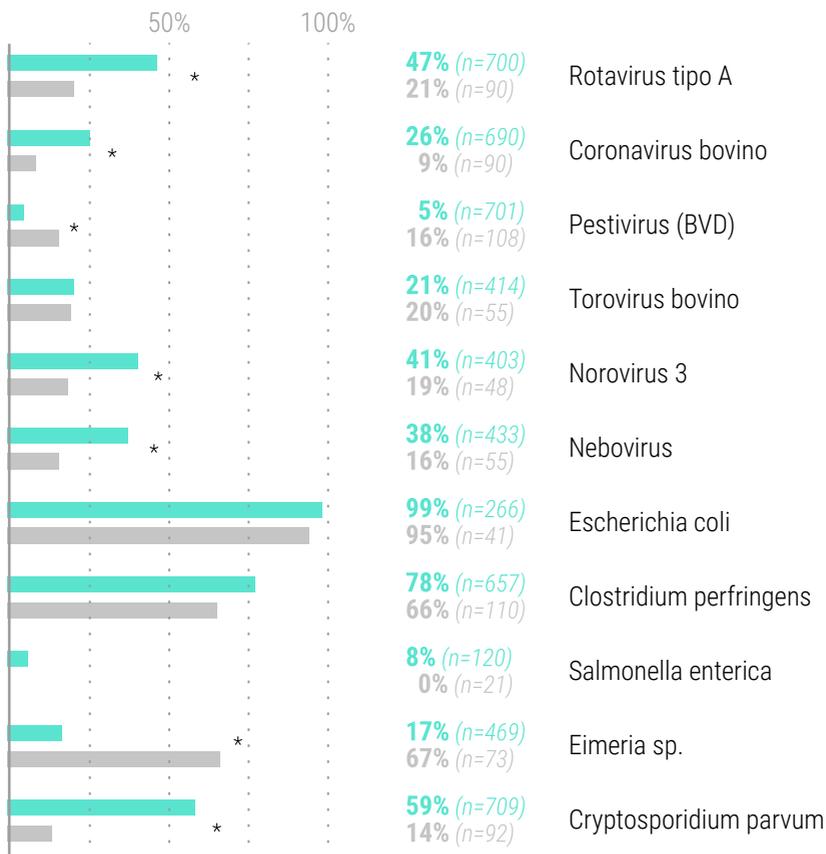
- ✓ evaluar si la cepa presente es la misma o diferente a la vacunal
- ✓ observar la presencia de nuevos genotipos en las granjas

• resultados estadísticos: diagnóstico

patógenos analizados en el panel digestivo por edades

% positivos analizados mediante qPCR

■ lactantes ■ destetados



Se ha evaluado la diferencia del número de positivos de cada uno de los patógenos analizados mediante la prueba estadística Chi-cuadrado. Se ha considerado que existen diferencias significativas entre el % de positivos entre los diferentes grupos de edad, si p -valor < 0,01 (*).

En animales lactantes se observa un mayor porcentaje de casos positivos a Rotavirus tipo A, Salmonella enterica y Cryptosporidium parvum. Torovirus, Norovirus y Nebovirus son considerados agentes emergentes en problema digestivos, principalmente en terneros lactantes.

En animales destetados y de cebo se observa una mayor presencia de *Eimeria* sp.



toxintipado de *Clostridium perfringens*

- ✓ saber qué tipo de toxinas produce la cepa detectada
- ✓ tomar decisiones sobre las medidas de prevención

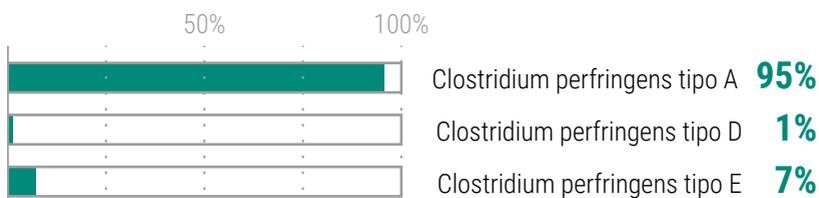
Se agrupa en 5 toxintipos (A, B, C, D, E) de acuerdo a la producción de 4 toxinas (alpha, beta, epsilon, iota).
Las cepas de estos toxintipos pueden ser también productoras de la enterotoxina (ENT) y toxina $\beta 2$.

	A	B	C	D	E
alpha	+	+	+	+	+
beta	-	+	+	-	-
epsilon	-	+	-	+	-
iota	-	-	-	-	+

- A** enteritis hemorrágica y gangrena gaseosa en terneros menores de 3 semanas
- B** disentería (muy poco frecuente)
- C** enteritis necrótica en terneros menores de 3 semanas
- D** enterotoxemia o basquilla en animales de cebo y adultos
- E** enteritis necrótico-hemorrágica en terneros

toxintipo de Clostridium perfringens

analizados 261 casos clínicos de 209 granjas mediante qPCR



presencia de factores de virulencia asociados a Clostridium perfringens tipo A



El toxintipo más frecuente es el tipo A. En el 3% de los casos se detectó una coinfección del toxintipo A con E.

Respecto a Clostridium perfringens tipo A, se observa una elevada presencia de cepas productoras de toxina β2. En otras especies animales esta toxina se ha relacionado con cepas de Clostridium perfringens tipo A de mayor capacidad patógena.



En función de sus factores de virulencia las cepas de *Escherichia coli* se pueden clasificar en cepas:

ETEC cepas enterotoxigénicas

presentan **fimbrias** para adherirse al epitelio intestinal (F5, F17, F4 o F41) junto a la **producción de toxinas** (Sta, Stb o LT) que producirán la **sintomatología clínica**
F5: la más frecuentemente encontrada en casos clínicos

EPEC cepas enteropatógenas

presentan **gen eae** que codifica la producción de una adhesina (intimina) lo que provoca **diarreas por malabsorción** al producirse una unión estrecha de la bacteria al intestino, **no estando su patogenia relacionada con la producción de toxinas**

STEC cepas productoras de shiga toxina

pueden causar **diarreas** debido al **efecto citotóxico de las shigatoxinas (Stx1 o Stx2)**, aunque la importancia de estas cepas radica en que pueden provocar una **intoxicación alimentaria humana**

EHEC cepas enterohemorrágicas

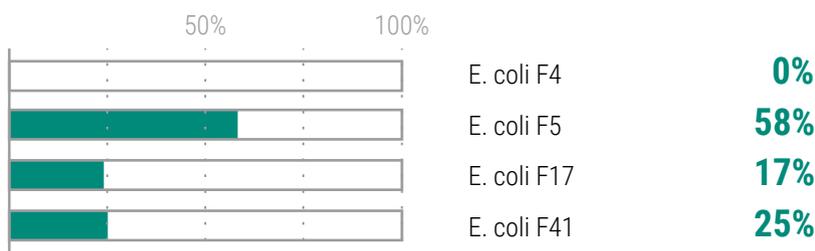
pueden causar **diarreas hemorrágicas** en terneros debido a la **acción de la intimina (gen eae) y shigatoxinas (Stx1 o Stx2)**

clasificación de las cepas de Escherichia coli detectadas en casos de colibacilosis



*Los resultados se obtienen comparando la concentración (inferida del valor Cq) de los genes codificantes de fimbrias e intiminas entre sí y con la concentración total de Escherichia coli en la muestra.

% de fimbrias presentes en cepas ETEC mayoritarias

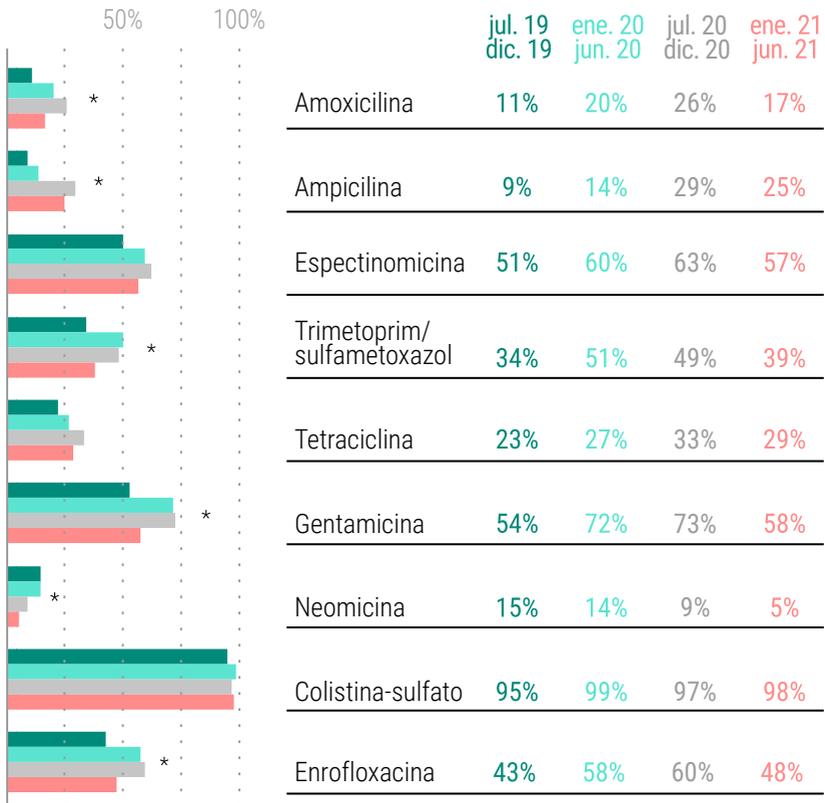


Las cepas EPEC son las detectadas en mayor porcentaje en los casos analizados (47%), sin embargo solamente se encuentran como cepas mayoritarias de E. coli en el 4% de las muestras, lo que sugeriría su implicación en la sintomatología.

La fimbria F17 se detecta en el 82% de los casos, estando en concentración mayoritaria, sin asociarse a toxinas, en el 27%. Estas cepas no se pueden clasificar como ETEC, pero se relacionan con clínica digestiva.

estudio de la sensibilidad antibiótica (Kirby Bauer) de *Escherichia coli*

comparación del porcentaje de sensibilidad de 652 antibiogramas realizados en los siguientes semestres:



Se ha evaluado la evolución de la sensibilidad de cada antibiótico a lo largo del tiempo mediante la prueba estadística Chi-cuadrado. Se ha considerado que las variables tiempo y sensibilidad son dependientes, es decir, que existen diferencias significativas entre % de sensibles de los diferentes periodos de tiempo, si p -valor $<0,01$ (*).

En general son cepas con elevada resistencia antibiótica que presentan menores porcentajes de sensibilidad a amoxicilina, ampicilina, tetraciclina y neomicina, de este último se observa una disminución significativa a lo largo del tiempo.

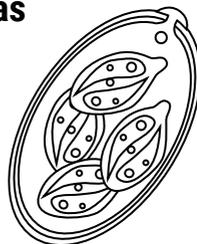
Estos resultados pueden estar relacionados con la existencia de genes de resistencias descritos en la literatura, aunque se ha observado un ligero aumento de la sensibilidad a ampicilina en función del tiempo.



detección de Eimerias patógenas

especies patógenas más importantes en la especie bovina:

- Eimeria bovis
- Eimeria zuernii
- Eimeria alabamensis



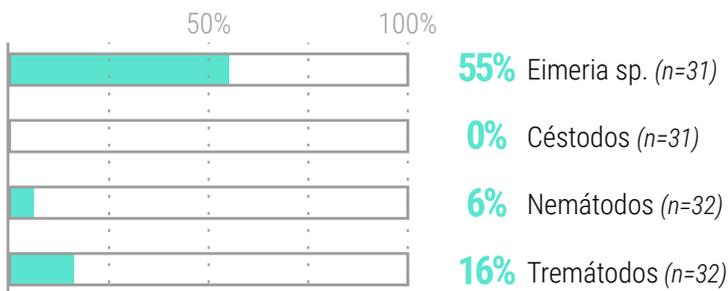
⚠ es importante valorar la presencia de las especies más patógenas, ya que los signos clínicos están más relacionados con la presencia de especies patógenas que con el recuento total de Eimeria sp. (especies con diferente grado de patogenicidad)

diagnóstico por qPCR sobre pools de heces (> 5gr.)

- ✓ valorar infestación por lotes, edades, etc.
- ✓ valorar la eficacia de un tratamiento (Cq)
- ✓ valorar la patogenicidad del proceso presente

patógenos analizados en el panel coprológico

% positivos analizados mediante qPCR desde noviembre de 2020

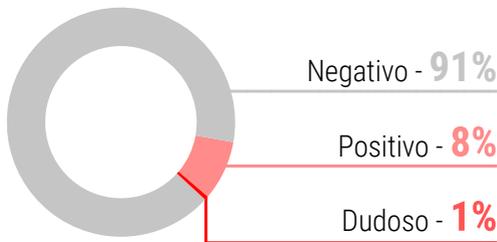


Se observa la presencia de un elevado porcentaje de Eimeria sp. Los tremátodos se detectan en segundo lugar, encontrando un 16% de muestras positivas.

La detección de parásitos mediante qPCR aporta mayor sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, automatización y rapidez de los resultados. Además, permite identificar a nivel de género y especie como en el caso de Fasciola hepatica y Dicrocoelium dendriticum.

estudio serológico de Paratuberculosis

% de sueros positivos respecto a los 19153 sueros analizados



Estos resultados proceden de animales adultos de explotaciones con sintomatología digestiva o para controles sanitarios (muestras sesgadas) y no deben ser tomados como datos de prevalencia.

Un resultado positivo es indicativo de un animal infectado de Paratuberculosis, mientras que en un animal seronegativo se deberá ampliar el estudio mediante qPCR sobre heces para aumentar la sensibilidad diagnóstica.



Paratuberculosis: enfermedad infecciosa crónica causante de adelgazamiento y diarrea

• **diagnóstico serológico**

sobre suero
más económica

• **diagnóstico por qPCR**

sobre heces, digestivos
e hisopos

	si el resultado serológico es	y el resultado por qPCR es	se confirma que el animal es
supuesto 1	negativo	negativo	negativo
supuesto 2	negativo	positivo	positivo
supuesto 3	positivo	positivo o negativo	positivo

• **resultados estadísticos: autovacunas**

autovacunas producidas frente a procesos digestivos

% de autovacunas que incluyen los distintos agentes

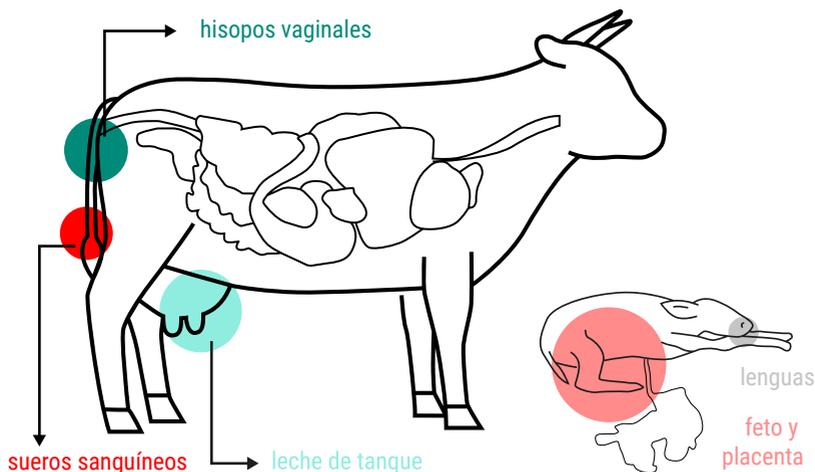


las cepas de **Escherichia coli** incluidas en las autovacunas digestivas son seleccionadas en base a los factores de virulencia que presentan



• procesos reproductivos

• toma de muestras



• paneles diagnósticos

Abortos:

qPCR: Leptospiras patógenas, Coxiella burnetii, Chlamydia abortus, Histophilus somni, IBR, Pestivirus, Neospora caninum

Infertilidad:

qPCR: Campylobacter fetus venerealis, Leptospiras patógenas, Coxiella burnetii, Chlamydia abortus, Ureaplasma diversum, IBR, Pestivirus, Tritrichomonas foetus

Infertilidad - Inseminación artificial:

qPCR: Leptospiras patógenas, Coxiella burnetii, Chlamydia abortus, Pestivirus, IBR, Ureaplasma diversum

Infertilidad - Monta natural:

qPCR: Campylobacter fetus venerealis, Tritrichomonas foetus

Metritis:

Microbiología: Cultivo, Cultivo de anaerobios

Reproductivo en leche de tanque:

qPCR: Leptospiras patógenas, Coxiella burnetii, Chlamydia abortus, Pestivirus, IBR

Serología Reproductivo:

Serología: Leptospira hardjo, Coxiella burnetii, Chlamydia abortus (Hipra), BVD p80/Border, IBR gE, Neospora caninum bovino

BVD (Bovela) - Diferenciación cepa vacunal:

qPCR: BVDV1 Bovela, BVDV2 Bovela

Pestivirus - Diferenciación:

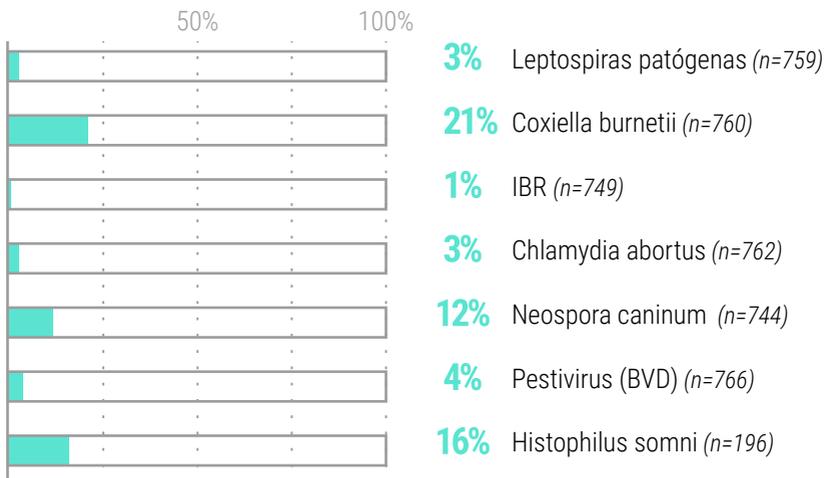
qPCR: BVDV1, BVDV2, BVDV3 (Hobi-like), Border Disease

Leptospira sp. - Tipado

● resultados estadísticos: diagnóstico

patógenos analizados en el panel abortos

% positivos analizados mediante qPCR

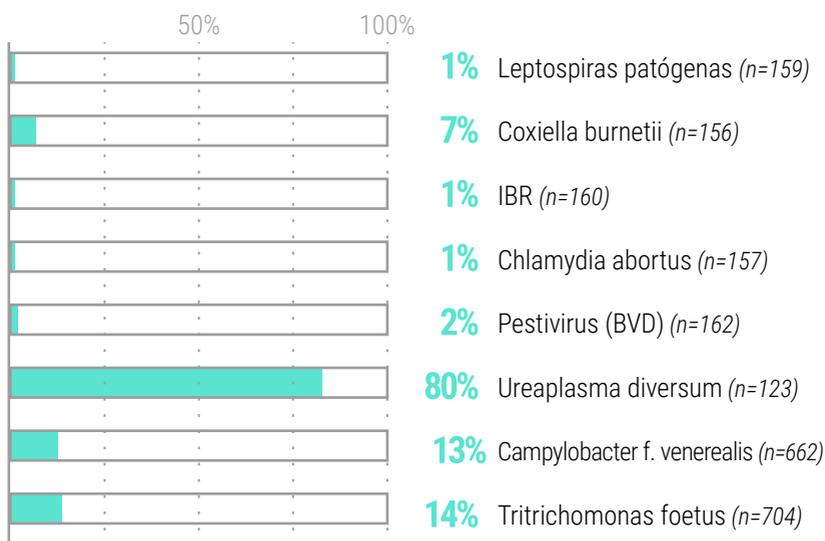


Coxiella burnetii es el agente detectado en mayor porcentaje. Su implicación en procesos abortivos es rara, siendo más frecuente como causante de infertilidad, metritis y bajada de producción láctea.

Histophilus somni se ha descrito en procesos reproductivos, pero es importante tener en cuenta la concentración detectada para evaluar su participación en el proceso.

patógenos implicados en procesos de infertilidad

% positivos analizados mediante qPCR



Ureaplasma diversum, *Campylobacter f. venerealis* y *T. foetus* son los tres agentes más detectados. Son patógenos reproductivos de transmisión venérea.

Ureaplasma diversum causa infertilidad y lesiones a nivel genital en hembras y machos. Aunque también se detecta en el tracto reproductivo de animales sanos. *Coxiella burnetii* es el agente no venéreo más detectado en problemas de infertilidad.

patógenos analizados en el panel serológico reproductivo

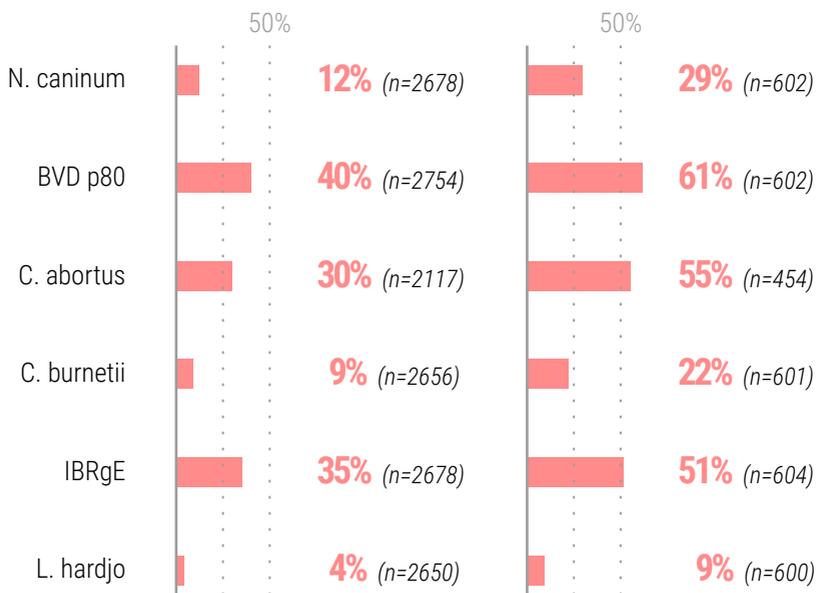
estudio de seropositividad mediante técnicas de ELISA



% sueros positivos
(animales individuales)



% casos positivos



Estos resultados no deben ser tomados como datos de prevalencia, ya que son muestras sesgadas de animales de explotaciones con problemas reproductivos.

Un resultado positivo puede indicar infección reciente, presencia de anticuerpos vacunales o un contacto previo con el agente no asociado al proceso reproductivo vigente.



análisis serológicos para detectar BVD

animal persistentemente infectado (PI)	<ul style="list-style-type: none"> anticuerpos negativos antígenos positivos
--	--

si tienes sospechas de la presencia de PIs en la explotación

1 la presencia de anticuerpos en los animales será elevada
análisis de anticuerpos (BVD p80)

2 sobre los animales negativos
análisis de BVD antígeno

explotación sin sospecha de PI con baja incidencia de BVD

1 **análisis de BVD antígeno**
por qPCR en puelles de sueros y desdoblamiento de los positivos

2 sobre los animales positivos
análisis de anticuerpos (BVD p80)

3 los **animales recién infectados** pueden no haber generado todavía anticuerpos a la hora del análisis (anticuerpos negativos + antígeno positivo) para diferenciarlos de animales PIs
repetir análisis de anticuerpos (BVD p80) a los 15 días

análisis de anticuerpos frente a BVD proteína 80

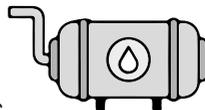
proteína que se expresa en la replicación del virus
(infección con cepa campo o vacunas)

- **vacunas inactivadas:** resultados negativos
- **vacunas vivas e infecciones campo:** resultados positivos



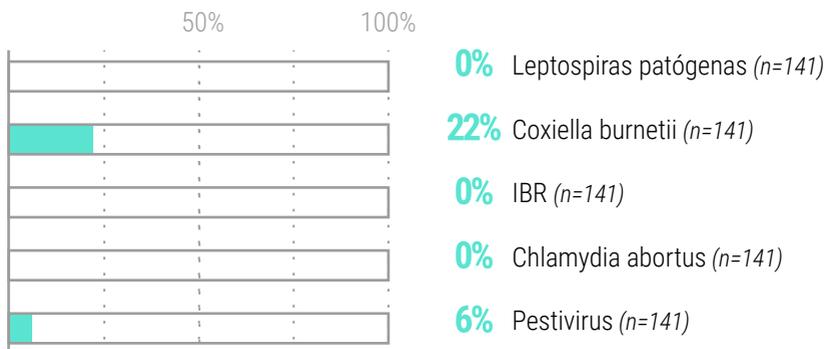
monitorización en leche de tanque

- ✓ detección de agentes infecciosos
- ✓ prever potenciales procesos patológicos
- ✓ monitorización de diversas enfermedades



patógenos reproductivos analizados en muestras de leche de tanque

% positivos analizados mediante qPCR

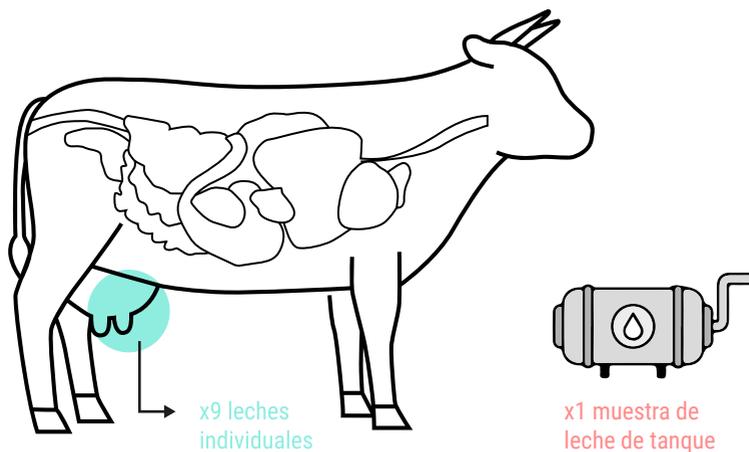


Coxiella burnetii es el agente más detectado. Su eliminación por leche no es continua, por lo que un resultado negativo en tanque no garantiza estar exento de enfermedad.

La monitorización de estos patógenos en la explotación a través del análisis en tanque ayuda a realizar el seguimiento de las enfermedades tras un proceso clínico y anticiparse a los problemas tanto de infertilidades como de abortos.

● mamitis

● toma de muestras



● paneles diagnósticos

Mamitis 9 + tanque:

Microbiología: Cultivo, Antibiograma

qPCR: *Mycoplasma bovis*, *Prototheca* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*

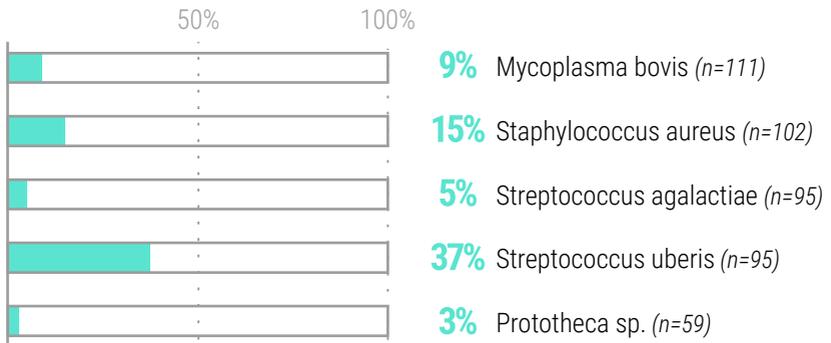
Mamitis tanque:

qPCR: *Mycoplasma bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Prototheca* sp.

● resultados estadísticos: diagnóstico

patógenos analizados en el panel mamitis en muestras de leche de tanque

% positivos analizados mediante qPCR

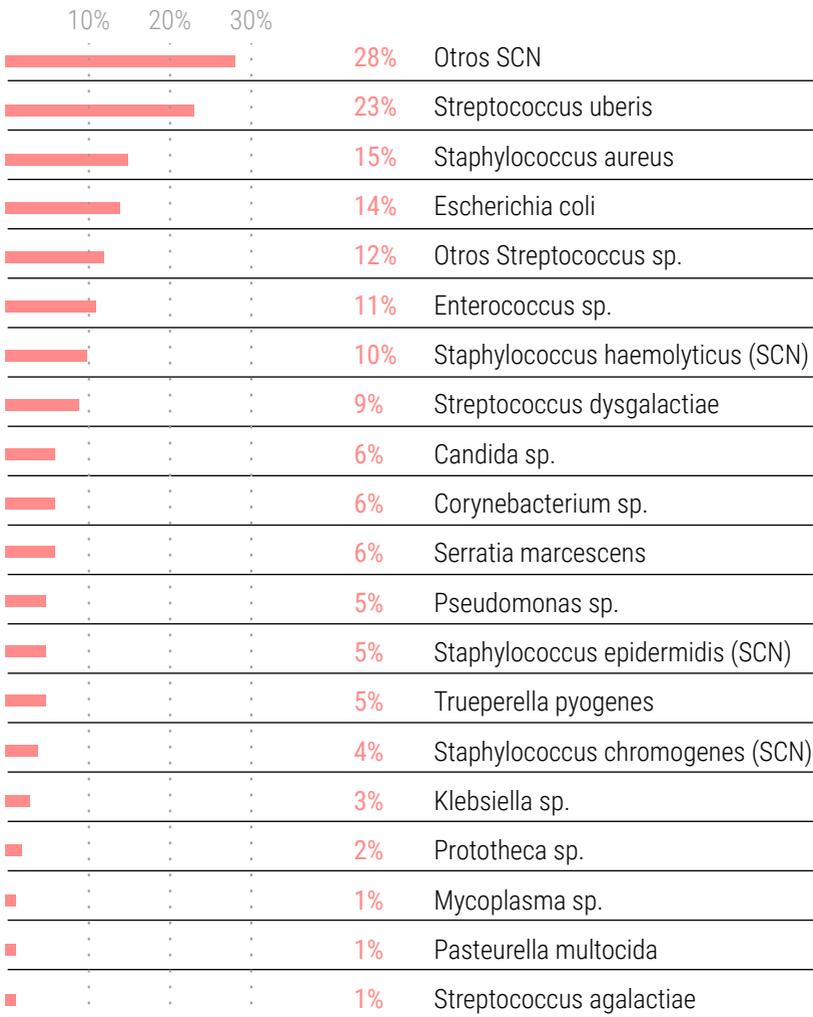


Streptococcus uberis es el patógeno detectado con mayor frecuencia, seguido de Staphylococcus aureus.

La monitorización en tanque sirve para detectar patógenos que se eliminan a través de la leche aunque no se observe enfermedad.

Cuando se detecta Mycoplasma bovis o Prototheca sp. en muestras de tanque es necesario localizar a los animales portadores, pues son dos patógenos contagiosos que no responden bien al tratamiento antibiótico por lo que es necesario la detección y eliminación de animales portadores para controlar la infección del rebaño.

patógenos aislados en cultivo microbiológico de 189 casos de mamitis



Al igual que en el tanque, mediante cultivo microbiológico de las leches individuales se han obtenido mayoritariamente aislamientos de *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus aureus* y, además se han aislado diferentes especies del grupo de los *Staphylococcus* Coagulasa Negativo (SCN).

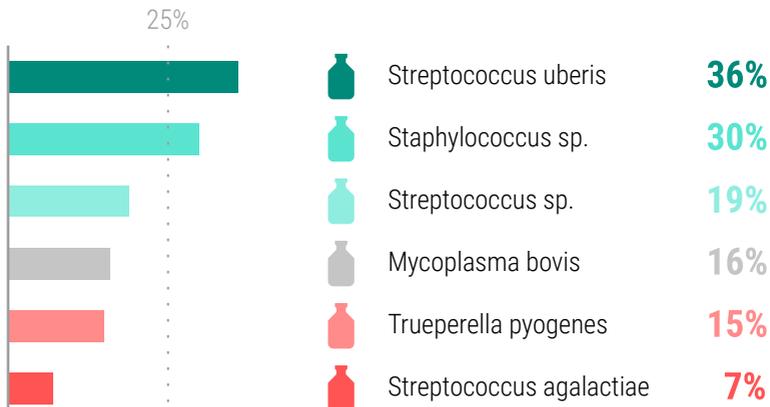
En general se observa una disminución en los casos clínicos relacionados con agentes contagiosos como *Streptococcus agalactiae*, esto es debido a las mejoras en manejo e higiene realizadas en el sector ganadero.

El aislamiento de *Mycoplasma* y *Prototheca* requiere unas condiciones y un cultivo específico y es más difícil la obtención de la cepa pura. Por ello es importante en el diagnóstico de ambos patógenos combinar ambas técnicas (qPCR y cultivo microbiológico) para aumentar la sensibilidad diagnóstica.

● resultados estadísticos: autovacunas

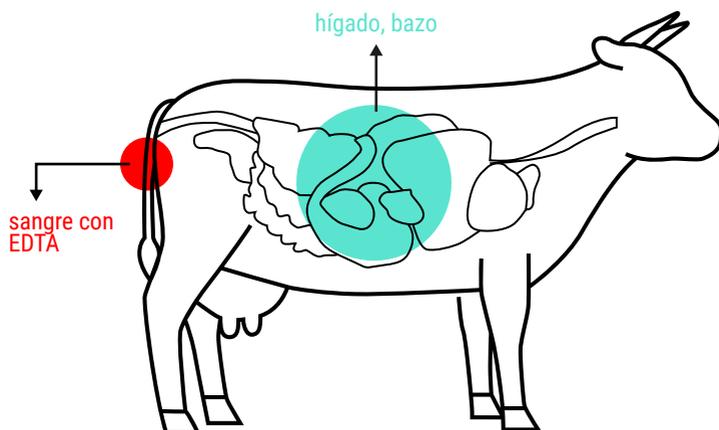
La mayoría de las autovacunas incluyen varias cepas, a menudo de diversas especies bacterianas, en función de lo que se ha obtenido en los diagnósticos, y por ello hay gran diversidad de combinaciones distintas. En la gráfica por tanto se representa el porcentaje de vacunas que incluyen los diversos agentes.

autovacunas producidas frente a procesos causantes de mamitis: % de autovacunas que incluyen los distintos agentes



● hemoparásitos

● toma de muestras



● paneles diagnósticos

Hemoparásitos:

qPCR: Piroplasmas, Babesia bigemina, Babesia bovis, Theileria annulata, Anaplasma sp., Anaplasma marginale, Mycoplasma wenyonii



es importante diferenciar los hemoparásitos implicados, pues hay especies que se consideran más patógenas

Piroplasmas: Babesia y Theileria

⚠ Babesia bigemina*, Babesia bovis*, Theileria annulata*

Anaplasmosis

⚠ Anaplasma marginale*

*son las especies presentes en la P. Ibérica y consideradas más patógenas, existen muchas más especies no patógenas y/o presentes en otros territorios

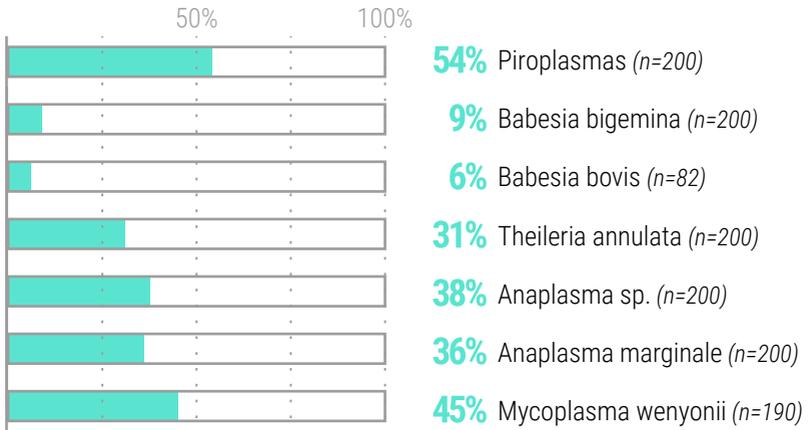
Mycoplasmas

⚠ Mycoplasma wenyonii: puede aparecer solo o en concomitancia con otros parásitos empeorando la clínica presente.

● resultados estadísticos: diagnóstico

patógenos analizados en el panel hemoparásitos

% positivos analizados mediante qPCR



En el 54% de los casos se detectaron piroplasmas, aunque no en todos se detectó una especie patógena.

Theileria annulata es la especie de piroplasma detectada en mayor porcentaje. Cursa con cuadros sistémicos graves (ictericia, anémica, caquexia, en ocasiones diarrea sanguinolenta) y no existen tratamientos eficaces.

● procesos oculares

● toma de muestras



hisopos de la conjuntiva

● paneles diagnósticos

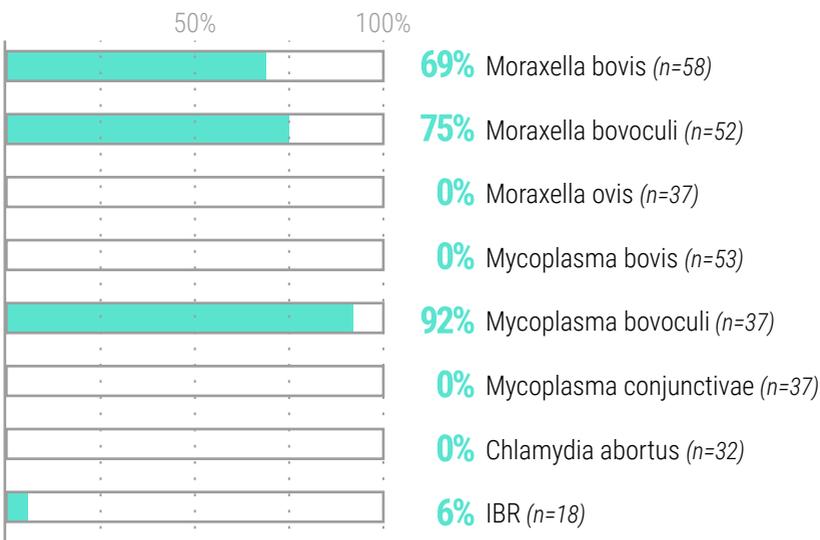
Ocular:

qPCR: *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, *Moraxella ovis*,
Mycoplasma bovis, *Mycoplasma bovoculi*, *Mycoplasma conjunctivae*,
Chlamydia abortus, IBR

● resultados estadísticos: diagnóstico

patógenos analizados en el panel ocular

% positivos analizados mediante qPCR



En la mayoría de los casos analizados se detecta *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* y *Mycoplasma bovoculi*.

Se cree que *Mycoplasma bovoculi* actúa como inmunosupresor y favorece la aparición de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina causada por las dos especies de *Moraxella*.

El resto de agentes analizados se han descrito de forma ocasional en procesos oculares.

● resultados estadísticos: autovacunas

autovacunas producidas frente a procesos oculares

% de autovacunas que incluyen los distintos agentes



autovacunas frente a *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi*

- ✓ eficaces para el control de la **queratoconjuntivitis contagiosa bovina**, para la que no disponemos de vacunas registradas



Polígono Río Gállego D/14
50840, San Mateo de Gállego
Zaragoza, España

www.exopol.com
976 69 45 25
exopol@exopol.com

