



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo fin de grado

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS MÉTODOS DE TOMA DE MUESTRAS DE LÍQUIDO
BRONCOALVEOLAR PARA EL DIAGNÓSTICO DE PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS EN OVINO

COMPARATIVE STUDY OF TWO METHODS OF SAMPLING OF BRONCHOALVEOLAR
FLUID FOR THE DIAGNOSIS OF RESPIRATORY PATHOLOGY IN SHEEP

Autora

MARÍA VALERO BORAO

Directores

DELIA LACASTA LOZANO

JAVIER ASÍN ROS

Facultad de Veterinaria

2018

ÍNDICE

<u>Resumen/Summary</u>	<u>3</u>
<u>Introducción</u>	<u>5</u>
1. Patologías que afectan a las vías respiratorias altas en el ganado ovino	6
2. Patologías que afectan a las vías respiratorias bajas en el ganado ovino	7
3. Diagnostico de las patologías respiratorias de las vías bajas	10
3.1 Métodos de diagnostico <i>in vivo</i>	10
3.2 Métodos de diagnostico <i>post mortem</i>	11
3.3 Diagnostico etiológico	12
A. Diagnostico etiológico <i>post mortem</i>	12
B. Diagnostico etiológico <i>in vivo</i>	12
<u>Justificación y objetivos</u>	<u>13</u>
<u>Metodología</u>	<u>14</u>
<u>Resultados y discusión</u>	<u>19</u>
1. Razas, sexo y edad de los animales analizados	19
2. Parámetros clínicos	20
3. Parámetros respiratorios	21
4. Estudio anatomopatológico	22
5. Resultados microbiológicos	24
6. Estudio comparativo entre las diferentes tomas de muestras	26
7. Resultados citológicos	27
<u>Conclusiones/ conclusions</u>	<u>29</u>
<u>Valoración personal</u>	<u>30</u>
<u>Bibliografía</u>	<u>30</u>
<u>Anexos</u>	<u>34</u>

RESUMEN

El presente trabajo de final de grado surge por la necesidad de obtener una prueba fiable para el diagnóstico etiológico *in vivo* de las enfermedades del aparato respiratorio en ganado ovino. Para ello se testaron, validaron y pusieron a punto dos técnicas de tomas de muestra: los lavados traqueobronquiales y nasobronquiales. Con estas muestras se realizaron estudios citológicos y microbiológicos, fueron analizados estadísticamente y comparados con los resultados microbiológicos de las muestras de necropsia.

Los animales utilizados fueron aquellos que presentaban clínica compatible con patología respiratoria de los recibidos en el Servicio Clínico de Rumiantes del Hospital Clínico de la Universidad de Zaragoza (SCRUM). A todos los animales recibidos se les realiza una exploración clínica general y una exploración pormenorizada del aparato respiratorio. Una vez seleccionadas aquellas que presentaban sintomatología respiratoria, se procedía a la realización de las dos técnicas. Posteriormente, eran sacrificados y se realizaba un estudio anatomopatológico.

La mayor parte de los animales presentaron aumento de la frecuencia respiratoria y cardíaca y baja condición corporal, signos clínicos comúnmente asociados a patologías respiratorias crónicas. Las enfermedades más comúnmente encontradas fueron: complejo respiratorio ovino con un 25%, seguido de Maedi Visna en su forma respiratoria. La correlación entre el diagnóstico por auscultación y lesión en necropsia fue de un 75,5%, lo que indica que mediante entrenamiento se puede llegar a diagnosticar un elevado porcentaje de patologías respiratorias de vías bajas.

Las muestras obtenidas en necropsia tuvieron un 71,4% de cultivos positivos, mientras que las muestras obtenidas de los lavados traqueobronquiales ofrecieron un 57,8% de aislamientos positivos, y un 35% en los lavados nasobronquiales. Sin embargo, los microorganismos aislados en cada una de las muestras no ofrecieron gran disparidad entre las técnicas, apareciendo *Trueperella pyogenes* y *Pasteurella multocida* como los principales microorganismos implicados en procesos respiratorios crónicos en ganado ovino adulto.

SUMMARY

This final degree project arises from the need to obtain a reliable test for the *in vivo* etiological diagnosis of diseases of the respiratory system in sheep. Therefore, two techniques were tested and validated: the tracheobronchial and nasobronchial lavage. Microbiological and cytological analyses were carried out in the samples and the results were statistically analyzed and compared with the microbiological results of the necropsy samples.

Animals used were those who had clinical signs compatible with respiratory pathology of those received in the Ruminants Clinical Service of the Hospital Clinic of the University of Zaragoza (SCRUM). A clinical examination was conducted in all the animals received at the service and detailed examination of the respiratory system was also carried out. Once those sheep that had respiratory symptoms were selected, both techniques were performed. Later, animals were euthanized and a full histopathological study was carried out.

Most of the analysed animals showed an increase in respiratory and cardiac rate and a low body condition; clinical signs commonly associated with chronic respiratory diseases. The diseases most commonly found were: ovine respiratory complex, with 25%, followed by Maedi Visna disease in its respiratory form. The correlation between the diagnosis by auscultation and the lesion found at the necropsy was 75.5%, which indicates that, with training, it is possible to diagnose most of the lower tract respiratory pathologies.

Seventy one point four per cent of positive cultures were obtained from injured lungs at necropsy, while samples from the traquobronchial lavage offered a 57.8% of positive isolates, and 35% in the nasobronchial lavage. However, the microorganisms isolated from each of the samples did not offer a large disparity among the different techniques, appearing *Trueperella pyogenes* and *Pasteurella multocida* as main microorganisms involved in chronic respiratory processes in adult sheep.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades del aparato respiratorio son unas de las patologías más comunes en el ganado ovino, siendo una de las principales causas de mortalidad y de pérdidas económicas en nuestras explotaciones (Lacasta et al., 2016). Además hay que recordar que, cuando hablamos de patología respiratoria, nos referimos tanto a la afección de vías respiratorias altas como de bajas.

Estas patologías engloban diferentes enfermedades, que pueden tener origen infeccioso, parasitario o ser debidas a problemas en el manejo, y todas de ellas implican unas importantes pérdidas económicas para el ganadero, tanto directas, asociadas a mortalidad, como indirectas por pérdida de peso, producción y desecho temprano de los animales (Lacasta et al., 2016). En un estudio llevado a cabo en esta Facultad para el desarrollo de un trabajo de fin de grado (Jorba, 2015), se concluyó que la patología respiratoria supone el 39,7% de causa de desecho temprano en el ganado ovino de carne en la provincia de Zaragoza. En este estudio se observó que las patologías más frecuentemente diagnosticadas en las ovejas de desecho fueron los procesos crónicos respiratorios siendo del total un (25,4%), y de este porcentaje, el Maedi Visna fue la principal causa, representando un 20%.

Las enfermedades respiratorias se han estudiado extensamente en los corderos, sin embargo, no se han realizado muchos estudios en ganado ovino adulto, a pesar de ser una de las patologías más frecuentes en estos animales (Mearns, 2009).

Las enfermedades que afectan el aparato respiratorio presentan una gran dificultad en el diagnóstico clínico debido a que casi todas ellas producen una sintomatología muy similar, lo cual hace complicado su diferenciación clínica. Además, el acceso a los métodos de diagnóstico complementarios en ovino es complicado a nivel de campo, haciendo difícil diferenciar ciertos tipos de patología o grados de afección (Lacasta et al., 2016). Algunos estudios han sido realizados para tratar de mejorar el diagnóstico clínico de estas enfermedades, analizando la relación entre la auscultación y la ecografía pulmonar en ovino adulto (Scott et al., 2010), sin embargo, siempre es recomendable combinar varios métodos de diagnóstico para tratar de decantarse por una patología, ya que solo la auscultación genera muchas dudas para alcanzar un diagnóstico definitivo. Además, una necropsia exhaustiva, a día de hoy, es la prueba de oro (gold standard) para lograr un diagnóstico correcto, siempre acompañado de la toma de muestras para microbiología e histología (Wäsle, 2017). Esto es así especialmente en el ganado ovino, ya que es un método asequible y muy utilizado en el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Benavides et al., 2015).

Sin embargo, para llegar a un diagnóstico certero es fundamental conocer el agente etiológico causante de la patología. De ese modo, podremos realizar los tratamientos oportunos dirigidos a solucionar el problema existente y tomar las medidas preventivas adecuadas para evitar la posible diseminación de la enfermedad.

Con todo esto, es necesario buscar una forma de diagnóstico etiológico rápida, de uso en campo, que permita la supervivencia de los animales, que sea fiable y que pueda darnos una idea de la patología a la que nos estamos enfrentando. A partir de esta premisa, hemos elaborado el estudio para el presente trabajo fin de grado.

1. Patologías que afectan a las vías respiratorias altas en el ganado ovino

Los síntomas clínicos asociados a la patología de vías respiratorias altas son: disnea inspiratoria, secreción nasal, estornudos, ronquidos, deformación craneal y linfonodos regionales aumentados de tamaño.

Las patologías que afectan al ganado ovino englobadas en este apartado son:

-Oestrosis:

Causado por la mosca *Oestrus ovis*, es una miasis cavitaria zoonótica. La sintomatología que acompaña a esta enfermedad es disnea inspiratoria y secreción nasal mucosa. El diagnóstico se basa en la sintomatología clínica que afecta a un elevado número de animales (patología colectiva) y se confirma con la presencia de larvas de esta mosca en los bebederos o comederos de la explotación. En la necropsia se pueden encontrar diferentes fases larvares en la cavidad nasal.

- Rinitis Crónica proliferativa:

Está causada por *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotipo 61: k:1,5,7, la cual es una bacteria saprofita de las fosas nasales, pero que cuando se introduce en el interior de las células epiteliales produce un proceso inflamatorio que puede llegar a ser muy grave. La enfermedad produce un ronquido húmedo muy característico, pudiéndose observar además de esto, una disnea inspiratoria que puede llevar al animal a respirar por la boca en casos muy avanzados. Macroscópicamente se observa el cornete ventral inflamado y a la sección crecimientos polipoides en su interior. En la histopatología se confirma el proceso inflamatorio con la presencia de multitud de neutrófilos y macrófagos.

- Adenocarcinoma nasal enzoótico:

Es un tumor benigno debido a la proliferación de células secretoras que se encuentran localizadas en el etmoides. A pesar de ser una enfermedad infectocontagiosa, nunca afecta a un elevado número de individuos en el rebaño. Es una enfermedad fácilmente diagnosticable por los síntomas clínicos que produce y que son: presencia de moco seroso y abundante

acompañado de una deformación craneal y exoftalmos en los casos más graves. Esta producido por un virus de la familia Retroviridae.

2. Patologías que afectan a las vías respiratorias bajas en el ganado ovino

En el ganado ovino adulto son varias las patologías que asientan en las vías respiratorias bajas, muchas veces difícilmente diferenciables únicamente por los signos clínicos. A continuación vamos a hacer una breve descripción de cuáles son estas patologías y de las principales diferencias entre ellas, tanto clínicas como lesionales.

- Adenocarcinoma pulmonar ovino (APO):

El adenocarcinoma pulmonar ovino es un tumor que afecta al parénquima pulmonar del ganado ovino y que está causado por el retrovirus Jaagsiekte (JSRV), transmisible de forma experimental, que afecta a las club cells y neumocitos tipo II, los cuales son células secretoras responsables de la clínica productiva de esta enfermedad (Palmarini et al., 1999; García-Goti et al., 2000). El periodo de incubación suele ser largo, por lo que es una enfermedad que se detecta siempre en animales adultos, a partir de los dos años de edad, aunque de forma esporádica se ha podido ver este tipo de tumor en corderos y animales mas jóvenes (Borobia et al., 2016).

Hallazgos clínicos: en esta patología el signo clínico más característico es la abundante descarga nasal bilateral de aspecto espumoso, que se aprecia al realizar la prueba de la carretilla o del descenso cefálico al animal (Cousens et al., 2009), la cual consiste en levantar las extremidades posteriores y descender su cabeza hacia el suelo para detectar la presencia de fluido saliendo por fosas nasales. También se pueden apreciar como signos clínicos, una disnea espiratoria o mixta, con sonidos productivos en la auscultación, junto con perdida progresiva de condición corporal (Griffiths et al., 2010).

Hallazgos anatomopatológicos: en la necropsia se observa espuma en tráquea y en los bronquios. El pulmón se ve aumentado de tamaño y peso y se observan áreas sólidas nodulares o difusas de color gris o violáceo, normalmente localizadas en la zona cráneo ventral en la forma típica de la enfermedad. Existe también la forma atípica, en la cual se observan nódulos blancos y endurecidos aislados, con una sección seca, además de esto, el fluido no es tan abundante como en la forma clásica. Histológicamente se ven células cuboidales que forman túbulos, papilas y acinis, normalmente con estroma fibroso (Griffiths et al., 2010).

- Enfermedad de Maedi Visna:

La enfermedad de Maedi Visna está producida por un lentivirus que afecta al ganado ovino y al caprino, teniendo mayor incidencia en determinadas razas ovinas. Las formas de presentación en el ganado ovino son: pulmonar, articular, nerviosa y mamaria. La forma de

transmisión es diferente según la edad de los animales, los corderos se infectan por transmisión calostrada y los adultos se pueden infectar por contacto directo (Pinczowski et al., 2017).

Hallazgos clínicos: los signos clínicos en esta enfermedad se observan cuando el animal ya es adulto, aunque éste se infectará en los primeros días de vida, ya que el periodo de incubación es muy largo. En la forma respiratoria de la enfermedad, los animales van perdiendo peso gradualmente, y se puede ir observando que el animal tiene dificultad respiratoria, con una disnea marcada tras el ejercicio, que va evolucionando lentamente. A la auscultación se nota un aumento de sonoridad difusa de todo el pulmón, sin sonidos productivos. El maedi visna suele ser una enfermedad afebril, a no ser que una infección bacteriana complique la patología (Pinczowski et al., 2017).

Hallazgos anatomopatológicos: en la necropsia se observan pulmones aumentados de volumen y peso, de forma acampanada y no colapsados, además, los nódulos linfáticos de la zona también se pueden observar aumentados de tamaño. La textura de los pulmones es gomosa con zonas de tono grisáceo. Histológicamente se observa neumonía intersticial difusa crónica e hiperplasia del tejido linfoide asociado a bronquios y bronquiolos linfoideperivasculares y peribronquiales (Pinczowski et al., 2017).

- Complejo Respiratorio Ovino en adultos (CRO):

Esta enfermedad es la principal patología respiratoria del ganado ovino, fundamentalmente en corderos, pero también en ganado adulto (González et al., 2016; Lacasta et al., 2016). Tiene diferentes formas de presentación: sobreaguda o septicémica, aguda y crónica, siendo los agentes etiológicos implicados más importantes: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma* spp. y *Bibersteinia trehalosi*.

Los hallazgos clínicos en esta patología variarán en función de la forma clínica en la que se presente, siendo, una enfermedad compleja en la que están implicados el sistema inmunológico del animal, su estado fisiológico y diferentes agentes etiológicos junto con factores ambientales. En la forma sobreaguda podemos encontrarnos signos relacionados con una septicemia con síntomas generales como pirexia, anorexia y depresión. En la forma aguda distinguimos un estado febril del animal, junto con anorexia y disnea en diferentes grados. En cambio, en la forma crónica, los síntomas clínicos serán parecidos a aquellas enfermedades crónicas productivas que afectan al pulmón, como son APO y neumonía gangrenosa, principalmente (Lacasta et al., 2016).

Los hallazgos anatomopatológicos también son muy variados y van desde neumonías fibrinonecrotizantes a catarral-purulentas, pero de forma más habitual suelen ser neumonías

catarrales, viéndose zonas de consolidación y localizándose, principalmente, en la zona cráneo ventral del pulmón (Lacasta, 2016).

- Neumonía verminosa o granulomatosa:

La neumonía parasitaria suele estar producida por parásitos de la familia *Protostrongylidae* y *Dictyocaulidae* y generalmente estar asociada a animales en pastoreo (Martin et Aitken, 2000; Sánchez et al., 2003).

Los hallazgos clínicos en los animales son: descarga nasal, taquipnea, disnea y pérdida de condición corporal (Pugh, 2002; Sánchez et al., 2003), aunque variarán en función del grado de parasitación de los animales.

Los hallazgos anatomopatológicos muestran una neumonía granulomatosa y eosinofílica de localización en borde dorsal del pulmón, en el caso de los *protostrongylidos* o caudo-dorsal, en caso de *Dictiocaulus*, siendo éstos los de mayor gravedad lesional. Los nódulos son de consistencia firme con zonas de posible necrosis caseosa (Ferrer et al., 2002; Sánchez et al., 2003).

- Linfadenitis caseosa o pseudotuberculosis:

La linfadenitis caseosa es una enfermedad crónica causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Tiene dos formas clínicas; la visceral y la superficial o cutánea, las cuales pueden coexistir en el mismo animal. La forma superficial está caracterizada por abscesos en los linfonodos superficiales y la forma visceral está asociada a abscesos caseosos en el parénquima de algunos órganos y linfonodos internos, como es el caso del linfonodo mediastínico (Fontaine y Baird, 2007). Incluimos esta enfermedad en el apartado de patología respiratoria porque en la forma visceral de la enfermedad se ven fundamentalmente afectados el nódulo mediastínico y el parénquima pulmonar, mostrando los animales, en ambos casos, clínica de tipo respiratorio, aunque también puede afectar a otras vísceras. La forma visceral es difícil de diagnosticar en animales vivos, ya que la clínica es muy inespecífica, haciéndose necesario recurrir a la necropsia para alcanzar un diagnóstico definitivo (Navarro et al., 2015).

Los hallazgos clínicos encontrados en esta enfermedad son los abscesos caseosos característicos y pérdida de peso progresiva. Cuando afecta al aparato respiratorio también puede observarse disnea sin sonido productivo, taquipnea y tos crónica. Los abscesos pueden romperse al llegar a cierto tamaño y su contenido salir hacia el parénquima pulmonar o incluso diseminarse llegando a traquea, siendo ésta la principal forma de diseminación de la enfermedad en forma de aerosol (Navarro et al., 2015).

Los hallazgos anatomopatológicos muestran linfonodos aumentados de tamaño y en la sección el material caseoso forma concreciones concéntricas en forma de “aros de cebolla”, en

cambio, en el pulmón se puede apreciar una neumonía caseosa multifocal (Ferrer et al., 2002; Estevao et al., 2006).

- Neumonía gangrenosa/ abscesos:

Este tipo de neumonía suele estar originada por una desviación de la ingesta, como por ejemplo trozos pequeños de paja, o por la diseminación sanguínea por un proceso séptico en otra zona del organismo (Biescas et al., 2009).

Los hallazgos clínicos en esta patología más característicos serían el hedor en el aire espirado (Lacasta et al., 2016), junto con tos productiva y disnea espiratoria o mixta con ronquidos y estertores.

En los hallazgos anatomopatológicos podemos observar focos blanquecinos multifocales, con zonas de necrosis o cavidades con bordes negros o verdosos, que pueden evolucionar a abscesos con zonas de necrosis (Biescas et al., 2009). Histológicamente estas áreas se corresponden con zonas de neumonía necrosupurativa con distinto grado de fibrosis según la cronología del proceso.

3. Diagnostico de las patologías respiratorias de las vías bajas

Como hemos visto, las patologías de vías bajas en el ganado ovino adulto son muy variadas, lo cual dificulta su diagnóstico. Además de esto, muchas de ellas, pueden tener un agente causal principal, pero pueden estar complicadas con otros agentes, lo cual puede complicar el diagnóstico y enmascarar los síntomas clínicos de la principal patología que está afectando al animal. Los síntomas clínicos son muy variables, y poco específicos, ya que, como ha sido explicado, todos los procesos productivos de vías bajas muestran una sintomatología similar, siendo difícil diferenciarlos en la exploración clínica (Scott, 2007).

3.1 Los **métodos de diagnóstico *in vivo*** para patologías que asientan en el aparato respiratorio son:

- Auscultación:

La auscultación es un método de diagnóstico que se basa en la detección de los sonidos producidos por el pulmón cuando éste está afectado. Pero éste es un método que puede mostrar cierta variabilidad en función del momento del día, realización de esfuerzos previos, estrés, etc., La auscultación es un método diagnóstico que nos ayudará a detectar presencia de patología respiratoria, pero con el que va a ser muy difícil concluir el tipo de patología concreto que padece el animal.

- Radiografía:

La radiografía, muy utilizada en pequeños animales para el diagnóstico de patología respiratoria, nos puede mostrar las zonas que posiblemente estén afectadas, pero solo

podremos localizar las zonas, haciéndose difícil detectar el tipo de lesión y la enfermedad concurrente. Además, en el ganado ovino la radiografía no es muy factible a nivel de campo, ya que habría que utilizar un aparato de radiografía portátil y esto tiene un coste difícil de amortizar en esta especie.

- Ecografía:

La ecografía puede ser un método muy útil a nivel de campo para detectar patología respiratoria, ya que hoy en día todos los veterinarios clínicos tienen un ecógrafo para llevar a cabo diagnóstico de gestación en el ganado, el cual puede ser utilizado para la detección de patología de tipo respiratorio. Pero ocurre, al igual que con la radiografía, que la ecografía nos va a dar una imagen de la zona lesionada y su localización, siendo, la mayor parte de las veces, difícil llegar a un diagnóstico final certero de la etiología.

- Tomografía axial computerizada (TAC):

Es un modelo de técnica diagnóstica por imagen que usa la radiación X para la obtención de cortes o secciones transversales con la finalidad de encontrar algún hallazgo patológico.

Es un interesante método de diagnóstico que ofrece imágenes muy certeras de las lesiones escaneadas y que ha sido introducido recientemente como método de diagnóstico en el servicio clínico de rumiantes del hospital clínico veterinario en la Universidad de Zaragoza. Es un método muy efectivo para diagnosticar el tipo de lesión, pero tiene el inconveniente de tener que trasladar al animal a la zona donde se encuentra el aparato y, sobre todo, el elevado coste que supone la prueba, así que su uso tiene un valor exclusivamente experimental, además de que, como en las pruebas diagnósticas ya mencionadas, solo se puede hacer una apreciación de las zonas afectadas y del tipo de lesión, pero no de la etiología.

3.2 Los **métodos de diagnóstico *post mortem*** son ampliamente utilizados en los animales de abasto debido a que son métodos sencillos, fiables y económicos. En el caso de la patología respiratoria que nos ocupa, consiste en la visualización, localización y descripción de las lesiones producidas en el pulmón y órganos anexos. El estudio macroscópico debe ir siempre acompañado de la toma de muestras de la zona lesionada, tanto para su estudio histológico como microbiológico. El estudio histológico normalmente se realiza con la tinción hematoxilina-eosina, para la visualización correcta de los diferentes tejidos y las posibles alteraciones ocurridas, tras la tinción siempre se deberá observar mediante microscopia para realizar un diagnóstico certero junto con los síntomas clínicos, los hallazgos macroscópicos, y los posibles cultivos realizados de las tomas de muestras en la necropsia.

3.3 Finalmente, y como hemos comentado anteriormente, el **diagnóstico etiológico** va a ser fundamental para el correcto tratamiento y prevención de las patologías respiratorias. Dicho diagnóstico puede ser llevado a cabo o bien en el estudio *post mortem*, mediante toma de muestras durante la necropsia, o bien *in vivo* mediante la realización de lavados broncoalveolares. En ambos casos, las muestras tomadas serán refrigeradas y llevadas lo más rápidamente posible al laboratorio para su estudio microbiológico.

A. Diagnóstico etiológico *post mortem*: la toma de muestras se lleva a cabo durante la necropsia, de la forma más aséptica posible, ya que es muy fácil errar el diagnóstico por muestras contaminadas, y se pueden realizar o mediante hisopado o recogiendo un trozo de parénquima lesionado. En los abscesos se debe tomar la muestra con hisopo de la zona de la capsula para evitar contaminaciones. En las zonas afectadas de procesos neumónicos se puede flamear la zona que se quiere tomar la muestra e introducir el hisopo en el interior del parénquima para evitar contaminaciones. Para llevar a cabo técnicas de diagnóstico moleculares (PCR) se puede realizar también a partir de un fragmento de tejido o con un hisopo de la zona lesionada.

B. Diagnóstico etiológico *in vivo*: el diagnóstico etiológico en el animal vivo únicamente se puede llevar a cabo mediante la toma de muestras directamente de bronquios y bronquiolos, ya que los microorganismos responsables de muchos de los procesos respiratorios que afectan a los rumiantes son saprófitos de vías respiratorias altas, de modo que una toma de muestras a ese nivel, nos puede llevar a diagnósticos erróneos. La toma de muestras de vías bajas en ovinos vivos se puede realizar mediante dos técnicas:

- Lavados traqueobronquiales:

Se realiza con una pequeña cirugía en la zona traqueal, por la cual se introduce un catéter por el que se introducirá una determinada cantidad de suero fisiológico estéril que se recogerá, en parte, para su posterior análisis.

- Lavados nasobronquiales:

Tienen la misma finalidad que el lavado traqueobronquial, pero en este caso consiste en la introducción de la sonda vía nasal hasta los pulmones.

El conjunto de todas estas pruebas nos puede encaminar a un diagnóstico etiológico, que será el que, finalmente, nos ayudará a aplicar medidas de tratamiento y prevención de la enfermedad (Benavides, 2015). Es importante tener en cuenta que es necesario realizar varias necropsias y tomar diferentes muestras para que el diagnóstico sea fiable, ya que un único animal puede no ser representativo del proceso que afecta a la granja.

El presente trabajo fin de grado se va a centrar en la comparativa de ambas pruebas diagnósticas en el ganado ovino adulto con el fin de determinar cuál puede ser más práctica y útil para llevar a cabo en las explotaciones ovinas.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La patología respiratoria tiene una gran relevancia en el ganado ovino adulto, ya que es la patología mayoritaria en estos animales, sin embargo, al contrario que en corderos, no está muy estudiada. Además, ha sido demostrado que las patologías que asientan en el aparato respiratorio son una de las principales causas del desvieje precoz en el ganado ovino adulto.

Son muchas las patologías que asientan en el aparato respiratorio del ovino, todas ellas con unos signos clínicos similares y difíciles de diferenciar mediante técnicas de diagnóstico por imagen. Además, es necesario saber qué gérmenes están implicados en el proceso para poder instaurar medidas terapéuticas y profilácticas adecuadas. Por todo ello, es necesario realizar un diagnóstico etiológico de la enfermedad. Éste se puede llevar a cabo en la necropsia, tomando muestras de la zona lesionada, pero en animales vivos la única manera sería mediante la realización de lavados broncoalveolares, los cuales han sido muy poco estudiados en el ganado ovino. Estos métodos, además, permiten tomar muestras de un número de animales suficientemente representativo para poder llegar a un diagnóstico final certero.

Por todo ello se lleva a cabo este trabajo de final de grado en el que se van a analizar de manera comparada las dos técnicas de lavado broncoalveolar aplicables al ganado ovino: lavados traqueobronquiales y nasobronquiales. El objetivo es poner a punto pruebas sencillas y fiables de toma de muestras en animales vivos que se puedan aplicar en las explotaciones ovinas, las cuales deberán ir siempre acompañadas de otras pruebas diagnósticas como la exploración clínica, auscultación, técnicas de diagnóstico por imagen y realización de necropsias.

Objetivos:

- Estudio clínico, anatomopatológico y microbiológico de los animales con patología respiratoria recibidos en el SCRUM.
- Puesta a punto de las dos técnicas de lavado broncoalveolar aplicables en ganado ovino: lavado nasobronquial y traqueobronquial.

- Comparación de los resultados microbiológicos de las dos técnicas de lavado broncoalveolar y de los resultados obtenidos en las muestras de los pulmones lesionados.
- Estudio citológico de las muestras obtenidas de los lavados broncoalveolares.

METODOLOGÍA

El siguiente estudio ha sido autorizado por el Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (Ref. PI50/16), aunque para la realización en campo de estas técnicas no es necesario ningún tipo de permiso especial, ya que se trata de pruebas con fines diagnósticos.

Fases de desarrollo del trabajo

- Revisión de las historias clínicas de los cursos anteriores, desde el 2014/15, sobre los animales a los cuales se les había podido realizar un lavado traqueobronquial o nasobronquial, durante su estancia en el Servicio Clínico de Rumiantes (SCRUM) del Hospital Clínico de la Universidad de Zaragoza.

- Clasificación de las historias clínicas de animales que presentaban patología pulmonar y de los cuales se tenían los resultados de microbiología de tejido y de lavados traqueobronquiales y nasobronquiales. Introducción de los datos en un programa estadístico para su posterior análisis.

- Realización de la exploración clínica completa de todos animales recibidos en el SCRUM que presentaron patología respiratoria durante el curso académico 2016/17. A estos animales se les realizó una exploración detallada del aparato respiratorio rellenando una ficha clínica creada especialmente para la ocasión.

- Realización de las dos técnicas de lavado broncoalveolar a todos los animales que mostraban sintomatología respiratoria durante la exploración clínica.

- Análisis citológico y microbiológico de las muestras obtenidas durante los lavados llevados a cabo en el Servicio de Anatomía patológica de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y en los Laboratorios Exopol.

- Estudio anatomopatológico de los animales analizados, tanto macroscópico como histológico llevados a cabo en el Servicio de Anatomía patológica de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

- Recopilación y análisis estadístico de todos los resultados obtenidos en las bases de datos del programa estadístico SPSS.

Diagnóstico clínico

Las patologías respiratorias analizadas en nuestro estudio las dividiremos en: enfermedades que afectan a las vías altas y las que afectan a las vías bajas, aunque hay animales que pueden presentar patología de altas y de bajas simultáneamente. De los animales analizados, únicamente cuatro mostraron patología de vías altas y estas fueron rinitis y sinusitis.

Para diagnosticar patología de vías respiratorias bajas la técnica diagnóstica empleada es la auscultación, con la que detectamos si el animal muestra disnea y de qué tipo es, así como la presencia de sonidos pulmonares (Scott, 2010). El tipo de disnea la clasificaremos en inspiratoria, espiratoria o mixta y esto, además, nos ayudará a determinar si se trata de patología de vías altas o bajas: disnea inspiratoria indica patología de altas y la espiratoria o mixta de vías bajas. Además, los sonidos pulmonares, junto con la tos, nos servirán para establecer si estamos ante un proceso productivo o no productivo, dato muy importante para tratar de encaminar un diagnóstico clínico. Por último, la localización de la lesión nos ayudará a determinar si estamos ante un proceso localizado o difuso.

El número total de animales analizados en el presente estudio fue de 53 ovejas adultas de diferentes razas, de las cuales 23 eran ovejas cuyos datos fueron recopilados de años anteriores y 30 fueron casos recibidos y analizados en el curso actual. Todos los animales del estudio fueron trasladados al SCRUM o bien como animales de desvieje o como casos clínicos remitidos por veterinarios de la zona.

Todos los animales que llegan al SCRUM son sometidos a un mismo protocolo diagnóstico, siendo la anamnesis la única diferencia entre los casos clínicos y los animales de desvieje procedentes de granjas colaboradoras, ya que en los casos clínicos recibidos es mucho más exhaustiva. Los animales son sometidos a una exploración clínica general y todos los datos recogidos son recopilados en una ficha clínica. Se realiza una hematología de rutina, así como otras pruebas complementarias, en función de la patología diagnosticada: ecografías, termografías, radiografías, urianálisis, ruminocentesis, etc. A continuación, la mayor parte de los animales son sacrificados humanitariamente para tratar de alcanzar un diagnóstico final certero. En la necropsia se toman muestras tanto para su estudio histológico como microbiológico.

Durante este curso académico se estudiaron en profundidad todos los animales recibidos en el SCRUM, seleccionando aquellos que mostraban sintomatología respiratoria, a los que se les realizaba un estudio clínico más profundo del aparato respiratorio, recogiendo los datos en una ficha clínica creada exclusivamente para este fin (Anexo I). A estos animales sospechosos se les realizaban pruebas diagnósticas complementarias como ecografías y

tomografía axial computerizada (TAC) para tratar de confirmar la presencia de lesión y así, posteriormente, pasar a realizar los lavados broncoalveolares objeto del presente estudio.

Lavados broncoalveolares

A la hora de realizar los lavados broncoalveolares es importante tener en cuenta que muchos de los microorganismos que producen patología respiratoria en los rumiantes son ubicuitarios de las vías respiratorias altas, de modo que al llevar a cabo el procedimiento es fundamental asegurarnos de que las muestras las estamos tomando directamente del pulmón. Después de realizar varias pruebas, se decidió llevar a cabo en primer lugar el lavado nasobronquial, siempre teniendo en cuenta que durante la realización de esta práctica podría haber una posible contaminación de bacterias ubicuitarias de la cavidad nasal hacia las vías bajas del respiratorio. Decidimos realizarlo de esta manera porque si se seda al animal para la realización en primer lugar del lavado traqueobronquial y posteriormente del nasobronquial, dicha sedación interfiere en la introducción correcta de la sonda a través de la nariz porque los cartílagos de la laringe, en concreto la epiglotis, está más relajada y el orificio de entrada es inferior. Esto lo pudimos comprobar en 5 animales, a los cuales se les realizó el sondaje nasobronquial con el animal sedado y posteriormente se sacrificaron sin sacar la sonda, pudiéndose comprobar que la sonda permanecía enrollada al final de la cavidad nasal, no habiendo alcanzado el pulmón. Además a esto, hay que tener en cuenta que al realizar el sondaje totalmente a ciegas, al disminuir el diámetro de la entrada a la tráquea, el procedimiento se hará mucho más complicado.

Para la realización del **lavado nasobronquial** se debe comenzar con la limpieza de los orificios nasales, para evitar, en todo lo posible, contaminaciones innecesarias. El animal debe situarse de pie, con la cabeza levantada hacia arriba, posicionándola lo más verticalmente posible para ayudar a la introducción de la sonda. Por una de las fosas nasales, elegida aleatoriamente, se introduce una sonda estéril lentamente, aprovechando las espiraciones del animal para avanzar. Cuando la sonda alcanza la zona de la faringe se debe observar si el animal deglute, en este caso se deberá sacar la sonda un poco y volver a intentarlo porque esto significa que la sonda se ha ido a esófago. Cuando la sonda atraviesa la laringe y se alcanza la tráquea, normalmente el animal tose, aunque esto no siempre ocurre, de modo que no podremos afirmar con rotundidad que hemos alcanzado las vías respiratorias bajas con este método. Una vez introducido la totalidad de la sonda, dejando unos 5-10 cm fuera de la cavidad nasal, se inyecta 20 ml de una solución salina estéril y tras ello se realiza la inmediata recuperación de esta solución mediante aspiración. De los 20 ml introducidos se recuperan,

aproximadamente, entre 1 y 2 ml, los cuales se almacenan en un tubo estéril para su posterior procesado.

Para la realización del **lavado traqueobronquial** se lleva a cabo la sedación del animal con Xylacina 2% (Xilagesic®) con dosis entre 0.25-0.5ml, dependiendo del peso. Tras la sedación, se rasura la zona lateral a la traquea en la zona media, se limpia el área de incisión y se aplica povidona yodada para desinfectar. Tras esto, se anestesia la zona con un mililitro de Lidocaína (Anesvet®) subcutánea, aplicada en abanico para cubrir la mayor área posible. Cuando la zona está totalmente anestesiada y estamos seguros que el animal no va a sentir nada, se desplaza la piel lateralmente y se realiza una pequeña incisión en la zona medial del cuello, quedando la incisión sobre la traquea. Cuando toda la zona está bien diseccionada y se localiza correctamente el espacio que existe entre los anillos traqueales, se introduce un catéter mediante punción entre los anillos traqueales y por dicho catéter se introducirá la sonda estéril unos 40 cm hasta el pulmón. En este caso, del mismo modo que para el lavado nasobronquial, se introducirán 20 ml de solución salina fisiológica estéril que será recuperada rápidamente, recogándose en este caso normalmente entre 3 y 8 ml de muestra. Tras esto, se retira el catéter y la sonda y se lleva la piel a su posición original para que no coincidan la incisión de la piel y la realizada en la tráquea. Posteriormente, se sutura la incisión de la piel con material reabsorbible y finalmente se aplica un spray antiséptico en forma de aerosol.

Diagnóstico anatomopatológico

Después de la realización de dichos métodos diagnósticos, el animal es sacrificado humanitariamente con pentobarbital sódico (Dolethal®) para su posterior **estudio anatomopatológico**. En todos los animales recibidos en el SCRUM se lleva a cabo una necropsia completa y seriada, pero en aquellos seleccionados para el estudio durante este curso, se prestó especial atención al aparato respiratorio, determinando el tipo de lesión macroscópica, así como su localización, la cual fue recogida en una ficha de necropsias (Anexo 1) y marcada en unas imágenes esquemáticas del pulmón. Además, se estudiaron en detalle tanto las vías respiratorias altas como el resto de la cavidad torácica para detectar posibles lesiones asociadas. Posteriormente, se tomaron muestras de las zonas lesionadas para su análisis microbiológico e histopatológico.

El **estudio histopatológico** se realizó para confirmar la sospecha de lesión macroscópica, siempre que fue necesario. Para la realización de este estudio las muestras fueron fijadas en formol al 10% durante 48 horas, posteriormente se procesaron de forma rutinaria para la obtención de la muestra histológica y se tiñeron con hematoxilina-eosina para su posterior observación al microscopio óptico.

El **estudio microbiológico** se llevó a cabo tanto de las muestras obtenidas de los lavados nasobronquiales y traqueobronquiales como de las recogidas en la necropsia de la zona lesionada, bien mediante hisopado o recogiendo un trozo de parénquima pulmonar afectado y fueron enviadas refrigeradas y con la mayor brevedad posible a los Laboratorios Exopol. Las muestras recogidas para microbiología fueron sembradas en Agar Columbia sangre (Oxoid), Agar MacConkey Nº 3 (Oxoid) y se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Tras 18- 24 horas se realizó la resiembra y cuando suficientes colonias en cultivo puro, se procedió a su identificación mediante pruebas bioquímicas y se preparó el antibiograma. Si aparecían pocas colonias y/o contaminadas con otras bacterias saprofitas o contaminantes, se realizaba la resiembra por agotamiento y cuando se tenía en cultivo puro se procedía igualmente a su identificación y antibiograma.

Las técnicas moleculares llevadas a cabo para la detección de algunos patógenos (PCR), consisten en la amplificación de un fragmento de ADN para la identificación de un virus o bacteria causante de la patología. Fueron llevadas a cabo mediante la realización de ciclos de altas y bajas temperaturas para la desnaturalización del ADN, tras lo cual se hacía una alineación y elongación del ADN existente para así poder identificar el agente.

Con todas las muestras obtenidas en ambos lavados, además, se realizó un **recuento celular** en cámara de Neubauer a concentración 1/5, así como citospin y tinción con panóptico rápido con en fin de caracterizar la población y concentración celular y, de ese modo, tratar de confirmar si los lavados se habían realizado correctamente. Además de esto, se intentó ver si existía alguna correlación entre algún tipo de población celular y los distintos tipos de neumonías, aunque se pudo comprobar que las células mayoritarias en todas las patologías eran macrófagos. Esta técnica sirve, además, para saber si las muestras se han obtenido bien o mal, ya que si el procedimiento ha sido correcto, deberemos visualizar macrófagos y neutrófilos en diferentes proporciones en las citologías, en cambio si no se visualizan células o solo se visualizan células epiteliales podremos confirmar que el lavado no se ha realizado correctamente.

Para el **estudio estadístico** los datos obtenidos en el presente trabajo se analizaron con el programa IBM SPSS 19.0 para Windows. Los datos se trataron realizando una estadística descriptiva con variables cualitativas como son: sexo, edad, raza, temperaturas de los animales, condición corporal, frecuencia cardíaca y respiratoria y mediante medias y desviaciones estándar para conocer cuales eran las más frecuentes en este estudio. Además de esto, se realizaron tablas de contingencia y Chi- cuadrado/test de Fischer/razón de verosimilitudes para determinar asociaciones, considerando significativo el dato cuando $p < 0.05$, como por ejemplo

en la ausencia o presencia de aislamiento. Las comparaciones de características cuantitativas y cualitativas se valoraron mediante:

- Valoración de la distribución de los datos (test de Kolmogorov-Smirnov considerando que si $p < 0.05$ los datos no siguen distribución normal)
- Comparación de los grupos (ej. lesión pulmonar SI vs lesión pulmonar NO) mediante la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney.

Con los datos obtenidos de los lavados se realizó también una estadística descriptiva, junto con la valoración de la distribución de los datos de contaje naso/traqueo (test de Kolmogorov-Smirnov considerando que si $p < 0.05$ los datos no siguen distribución normal) y las comparaciones entre los recuentos de las dos pruebas mediante el test de Wilcoxon (significativo cuando $p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Raza, sexo y edad de los animales analizados

En el total de los 53 animales analizados en el presente estudio la raza mayoritaria fue la raza Rasa Aragonesa (83%). Esto se explica por la situación geográfica de la Facultad de Veterinaria, ya que la mayoría de las explotaciones cercanas a Zaragoza, explotan esta raza, además de que la mayoría de los animales analizados son animales de desvieje procedentes de granjas colaboradoras, todas ellas pertenecientes al libro genealógico de la raza Rasa Aragonesa.

En lo referente al sexo, el 98% de los animales estudiados eran hembras. Esto está en concordancia con el número de hembras presentes en las explotaciones, que suele ser entre un 96 y un 98%.

En cuanto a la edad media obtenida de los individuos analizados fue de 5,56 años, aunque cabe destacar que unos pocos valores de la variable acumulan las frecuencias más altas, concretamente los 6, 7 y 8 años, esto es normal teniendo en cuenta que el 94.3% de los animales analizados son ovejas de desecho procedentes de las granjas colaboradoras (Figura 1).

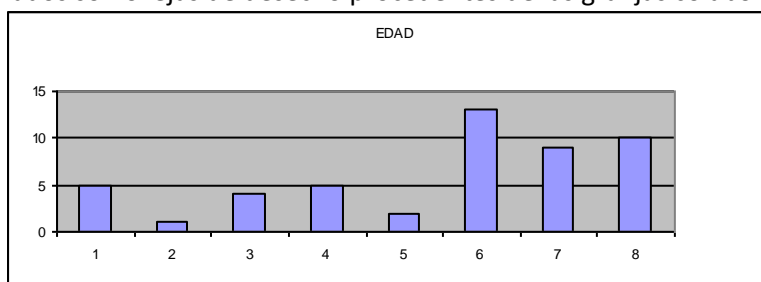


Figura 1: análisis de las edades de los animales analizados.

Parámetros clínicos

Aunque se llevó a cabo una exploración clínica completa de todos los animales, para el estudio estadístico del presente trabajo únicamente se han analizado los siguientes parámetros por su relación con la patología respiratoria que nos ocupan: temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y condición corporal.

La media y la desviación estándar de los parámetros clínicos analizados se muestran en la Tabla 1, pudiéndose observar que el parámetro que presenta menor variabilidad entre los animales es la temperatura y el que muestra mayores diferencias es el de la de frecuencia respiratoria. Además, tanto la media de la frecuencia respiratoria como la de la cardíaca están por encima del rango superior de normalidad para la especie ovina (15-30 respiraciones por minuto y 70-90 latidos por minuto), manteniéndose la temperatura dentro de los rangos de normalidad (38,5-40°C).

Tabla 1: media y desviación estándar de los diferentes parámetros clínicos analizados.

	N	Media	Desviación estándar	Covarianza
F.Resp.	53	41,21	23,050	0.56
F. Card.	53	107,43	24,703	0.23
C.C.	49	1,99	0,584	0.29
Tº	53	38,96	0,582	0.01

Con respecto de la condición corporal, los datos muestran como media una baja condición corporal, por debajo de 2. Como cita la bibliografía, la patología respiratoria crónica va siempre acompañada de pérdida de peso (González et al., 2016) y esto se ve reflejado en los animales del estudio.

A continuación mostramos los histogramas de la frecuencia respiratoria y cardíaca (Figura 2 y 3), en los que se puede observar que la mayor parte de los animales analizados muestran una frecuencia respiratoria ligeramente por encima de los rangos de normalidad. Esto es debido a que las patologías respiratorias crónicas, mayoritarias en los animales de nuestro estudio, producen cierto grado de taquipnea que va a ir asociada a la proporción de parénquima pulmonar afectado, pero que en ningún caso es tan elevada como en los procesos agudos o sobreagudos, en los que el compromiso pulmonar es mucho más elevado.

Con respecto a la información que ofrece el histograma de la frecuencia cardíaca se puede observar que la mayor parte de los animales se encuentran por encima del rango de

normalidad para la especie. Esto podría ser debido a que el momento de la exploración clínica les supone a las ovejas un elevado grado de estrés, que comúnmente se manifiesta con la aparición de taquicardia, pero también a la taquipnea asociada a estos procesos.

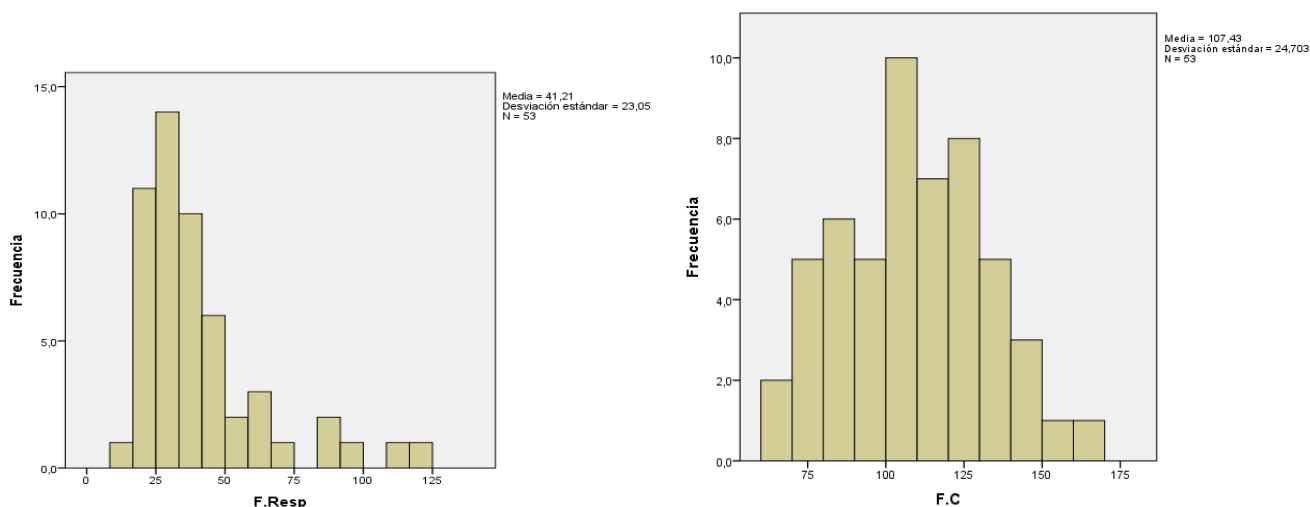


Figura 2 y 3: histogramas de las frecuencias respiratoria y cardíaca de los animales analizados.

Parámetros respiratorios

Solo 12 animales de los analizados no presentaban ningún tipo de disnea, 3 presentaban disnea de tipo inspiratorio, 16 espiratoria y 22 animales mostraban disnea mixta.

Con respecto al tipo de procesos productivos o no productivos, en los animales del estudio se pudo observar que la auscultación fue productiva en 26 ovejas, lo que supone un total del 49,6% de los animales analizados. En el 50,4% de las ocasiones la auscultación era seca.

En la Tabla 2 se puede observar que la mayor parte de los procesos fueron bilaterales (64,2%), siendo en un 33,96% del total la auscultación bilateral y productiva y en un 11,32% unilateral y productiva. Del mismo modo, en los procesos no productivos, un 9,43% era unilateral y en un 26,41% era bilateral en los animales analizados en el presente estudio. El tipo de auscultación más frecuentemente encontrada fue la bilateral y productiva que la padecieron un 33,96% de los animales estudiados.

Tabla 2: frecuencia de aparición de lesión pulmonar y localización de la misma mediante auscultación.

	Frecuencia	Porcentaje
Ausencia	7	13,2
Unilateral	12	22,6
Bilateral	34	64,2

Estudio anatomopatológico

La lesión traqueal por aplastamiento es muy frecuente en el ganado ovino criado en régimen de estabulación en alguna de las etapas productivas. En un estudio llevado a cabo por Ortega et al. (2017) analizaron 7699 animales en 21 explotaciones de ovino y encontraron una prevalencia individual de aplastamiento traqueal de un 9,95%. Aunque mediante palpación es posible detectar la lesión en los animales vivos en la mayor parte de las ocasiones, en nuestro estudio, como todos los animales analizados fueron necropsiados, analizaremos este parámetro en el estudio *post mortem*.

De los animales estudiados, un 41,8% presentaban algún grado de aplastamiento traqueal. En comparación con los datos obtenidos por Ortega et al. (2017), éste porcentaje podría parecer muy elevado, sin embargo, si tenemos en cuenta que los animales analizados en este estudio son animales de desecho con edad avanzada y lo comparamos con los animales de ese rango de edad que presentaban lesiones en el estudio de Ortega et al., comprobamos que los animales de más de 7 años mostraban un 63% de presencia de aplastamiento traqueal, porcentaje todavía superior al obtenido en nuestro trabajo. La tabla 3 muestra los tipos de lesiones halladas en la tráquea de las ovejas analizadas.

Tabla 3: lesiones traqueales en los animales analizados.

	Frecuencia	Porcentaje
Ausencia	27	50,9
Hemorragias	1	1,9
Aplastamiento	23	43,4
Otras	1	1,9
Aplastamiento+Otras	1	1,9

Al analizar el tipo de lesión pulmonar, observamos una elevada variabilidad (Figura 4), siendo la principal lesión observada la neumonía de tipo catarral, con un 20% de los animales analizados. Tanto la neumonía catarral como la fibrinosa son las dos lesiones asociadas al Complejo Respiratorio Ovino (CRO), de modo que será ésta la principal patología presente en los animales analizados (25%). La neumonía intersticial asociada a la forma pulmonar de la enfermedad de Maedi Visna sería la segunda en importancia (17%). Estos datos están en concordancia con los observados por Lacasta et al. en estudios llevados a cabo con anterioridad en este servicio (Lacasta et al., 2016), en los que al igual que en nuestro trabajo, las principales lesiones observadas estaban relacionadas con el CRO, seguido de cerca por la neumonía intersticial asociada a Maedi Visna.

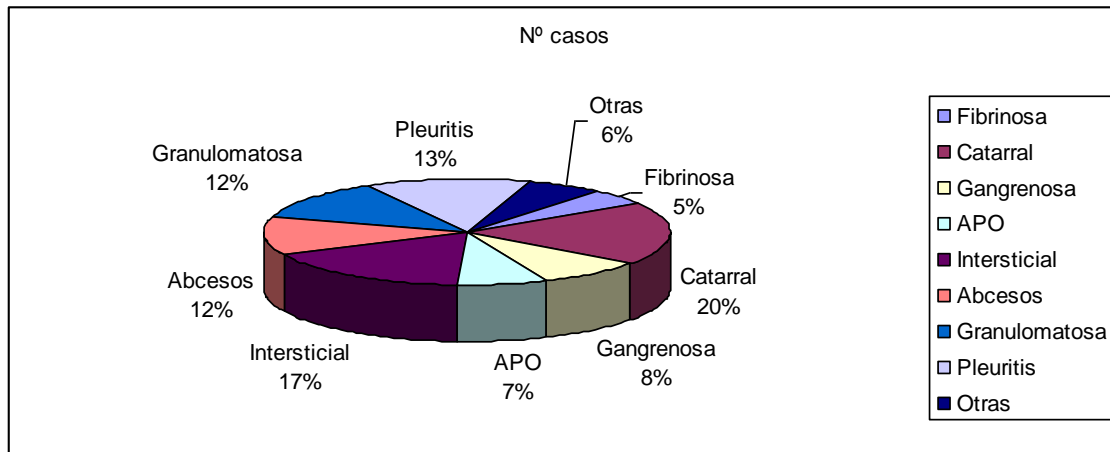


Figura 4: frecuencia de tipo de lesión pulmonar en los animales analizados.

Para hacer el estudio comparativo entre auscultación y lesión pulmonar hallada durante la necropsia tenemos que definir qué lesiones de las encontradas son de tipo productivo. Se consideran lesiones pulmonares productivas las siguientes: neumonía fibrinosa, catarral, pleuritis, APO, neumonía gangrenosa y abscesos. De modo que si analizamos conjuntamente las lesiones productivas halladas en la necropsia, estas suponen un 58.5% del total de animales analizados (31). Si lo comparamos con los 26 animales con lesión productiva detectados durante la exploración clínica, podemos concluir que mediante la auscultación detectamos el 83,9% de los animales que presentaban lesiones productivas, quedando 5 animales que posteriormente presentaron lesión productiva en la necropsia sin diagnosticar in vivo, lo cual supone un 16,1%. Estos datos muestran cierto grado de concordancia con los obtenidos por Lacasta et al. en 2016, en los que un 24,1% de los animales que se dieron negativos a patología pulmonar en la exploración clínica, mostraron en la necropsia algún tipo de lesión pulmonar. Sin embargo, en este trabajo, de los que se diagnosticaron como animales enfermos de vías bajas en la exploración clínica, un 81,8% presentaron a la necropsia algún tipo de lesión pulmonar (Lacasta et al., 2016). Basándonos en este estudio y en los datos obtenidos por nosotros, parece observarse que hay determinado tipo de lesiones pulmonares que son más difíciles de detectar en la exploración clínica y éstas serían fundamentalmente los abscesos, porque no producen ningún tipo de sonido productivo, y las neumonías intersticiales, cuyo único signo clínico sería la disnea.

Si analizamos la localización de las lesiones pulmonares podemos observar que, al igual que se detectaba durante la auscultación, la mayoría de las lesiones fueron bilaterales, con un 64,1% de los pulmones estudiados (Tabla 4), siendo diagnosticadas como bilaterales durante la exploración clínica un 64,2%, porcentaje muy similar.

Tabla 4: frecuencia de aparición de lesiones unilaterales y bilaterales en los animales analizados.

	Frecuencia	Porcentaje
Ausencia	8	15,1
Unilateral	11	20,8
Bilateral	34	64,1

Finalmente, si analizamos la asociación estadística entre la presencia de sintomatología respiratoria y la aparición de lesión pulmonar en la necropsia, observamos que en el 75,5% de los animales que mostraban clínica respiratoria presentaban algún tipo de lesión pulmonar.

Resultados microbiológicos

- **Parénquima pulmonar**

Del total de muestras de parénquima pulmonar afectado recogido durante la necropsia, solamente un 71.4% mostraron aislamiento positivo, mientras que en un 28.6% el aislamiento fue negativo.

Los principales microorganismos aislados fueron *Pasteurella multocida* y *Trueperella pyogenes* seguido de *Mycoplasma ovipneumoniae*. En la Figura 5 se pueden observar el número de aislamientos de microorganismos según las principales patologías encontradas.

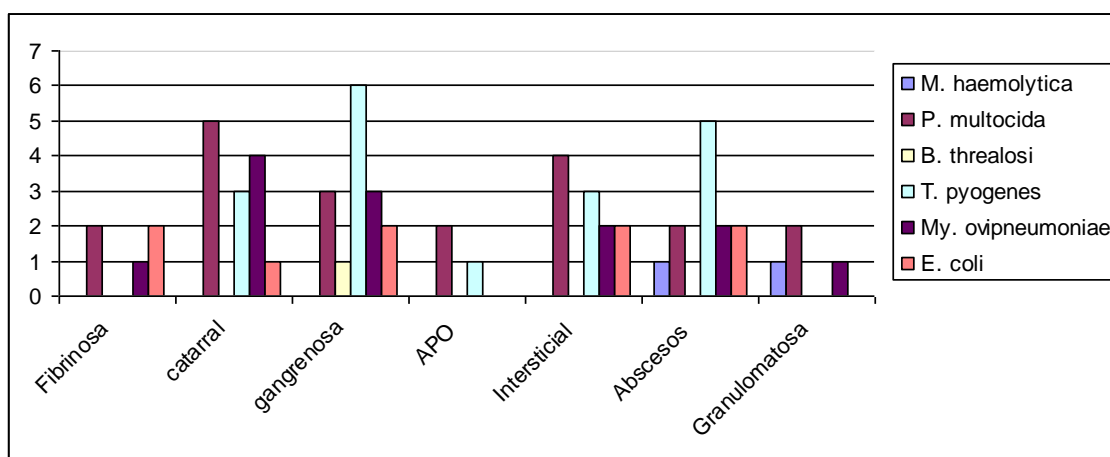


Figura 5: microorganismos más importantes aislados en las diferentes patologías encontradas.

Como se puede observar en la figura 5, *P. multocida* aparece fundamentalmente asociada a las neumonías catarrales y fibrinosas relacionadas con el CRO y *T. pyogenes* aparece mucho más comúnmente asociada a neumonías de tipo gangrenoso y abscesos, al igual que se ve en el estudio realizado por Azizi et al. (2013).

- **Lavados traqueobronquiales**

En las muestras obtenidas de los lavados traqueobronquiales únicamente se obtuvieron resultados positivos en el cultivo microbiológico en un 57.8% de los animales analizados. Este bajo porcentaje también se pudo observar en el estudio realizado por Sheehan (2016), en el cual compara los aislamientos de los lavados broncoalveolares con la toma de muestras realizadas con hisopos pulmonares para *M. haemolytica* y *My. ovipneumoniae*, obteniéndose unos porcentajes de aislamientos mucho menores en los lavados. De las 76 muestras analizadas en este estudio obtuvieron 20 aislamientos positivos a *M. haemolytica* en pulmón frente a 3 en los lavados; con respecto a *My. ovipneumoniae* se obtuvieron 25 cultivos positivos en la muestra pulmonar frente a 3 mediante lavados para el mismo número de muestras.

A pesar del bajo porcentaje de aislamientos positivos obtenidos en este muestreo, pensamos que es una técnica sensible y fiable para realizar toma de muestras del aparato respiratorio en animales vivos, siendo necesario tener en cuenta que habrá que incrementar el número de animales muestreados para asegurar un correcto diagnóstico de la patología que padecen los animales.

A continuación mostraremos los aislamientos microbiológicos obtenidos en los lavados traqueobronquiales según la lesión pulmonar encontrada a posteriori en la necropsia (Figura 6).

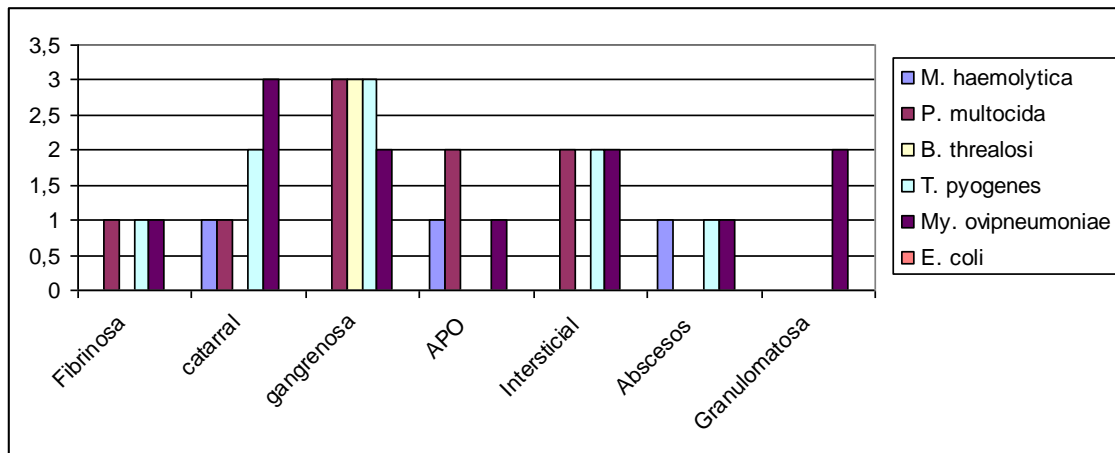


Figura 6: microorganismos más importantes aislados en las diferentes patologías.

Como se puede observar en la Figura 6, en este caso el porcentaje de aislamientos de *P. multocida* se incrementa en las neumonías de tipo gangrenoso, intersticial y APO, siendo más bajo en las neumonías asociadas al CRO. Sin embargo, *T. pyogenes* sigue muy presente en las neumonías gangrenosas y en los abscesos, aunque también aparece en un elevado porcentaje de las neumonías de tipo intersticial.

- **Lavados nasobronquiales**

En el caso de los lavados nasobronquiales el porcentaje de aislamientos positivos desciende drásticamente en comparación con los otros dos muestreos, obteniéndose tan solo un 35% de aislamientos positivos en este tipo de muestras. Esto sea en parte probablemente debido a los errores en el desarrollo de esta técnica que se cometieron al comienzo del presente trabajo.

Sin embargo, los microorganismos aislados son similares a los obtenidos en los otros muestreos (Figura 7), desapareciendo, sin embargo, el aislamiento de *T. pyogenes* en las neumonías gangrenosas.

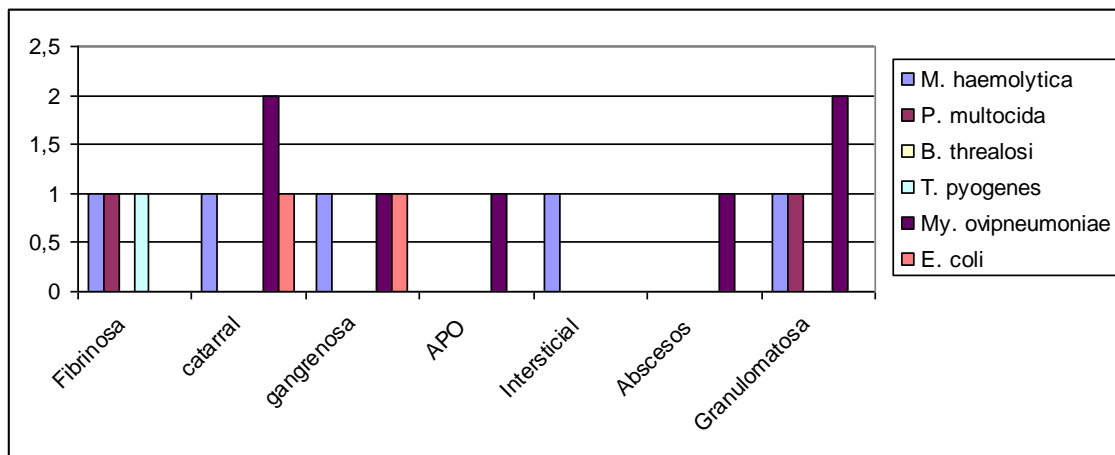


Figura 7: microorganismos más importantes aislados en las diferentes patologías.

Analizando en conjunto todos los aislamientos microbiológicos obtenidos de los lavados broncoalveolares durante este estudio se puede concluir que los patógenos que muestran una asociación significativa con el tipo de lesión pulmonar son *P. multocida* y *B. threalosi*, mostrándose relación entre la presencia del germen y el tipo de lesión pulmonar asociada.

Estudio comparativo entre las diferentes tomas de muestras

A continuación vamos a realizar el estudio comparativo entre los resultados obtenidos en las muestras recogidas en las diferentes tomas de muestras.

- **Comparación entre las muestras obtenidas de tejido pulmonar lesionado y de las recogidas por lavado traqueobronquial**

Al realizar el estudio comparativo de estas dos muestras se obtienen tres agentes cuya frecuencia de aparición es común en ambos muestreos: *Bibersteinia threalosi*, *Pasteurella multocida* y *Mycoplasma ovipneumoniae*. De modo que podríamos concluir que los lavados traqueobronquiales son útiles para el diagnóstico de Complejo Respiratorio Ovino.

- **Comparación entre las muestras obtenidas de tejido pulmonar lesionado y de las recogidas por lavado nasobronquial**

En este caso, los agentes que muestran correlación entre ambos tipos de muestras son: *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli* y *Mycoplasma ovipneumoniae*. Aunque en el caso de los lavados nasobronquiales el número de aislamientos positivos fue mucho menor, también podemos concluir que esta técnica sería de utilidad para el diagnóstico de agentes asociados al Complejo Respiratorio Ovino.

- **Comparación entre las muestras obtenidas por lavado traqueobronquial y por lavado nasobronquial**

Al comparar ambas técnicas de recogida de líquido broncoalveolar se obtienen unos resultados más exiguos, mostrando correlación únicamente *My.ovipneumoniae*, el cual apareció en un elevado porcentaje en ambos muestreos.

Resultados citológicos

A continuación mostramos los resultados obtenidos de los recuentos citológicos de los diferentes muestreos realizados.

- **Lavados traqueobronquiales**

Las citologías realizadas en los lavados traqueobronquiales, revelaron que el recuento medio mediante la cámara de Neubauer fue de $10968,97 \pm 12673,87$. Además de eso, se pudo ver el recuento celular mediante la citología del líquido obtenido, y mostró que los macrófagos tenían una media de $74,59 \pm 36,63$; los neutrófilos fueron de media $15,00 \pm 26,49$. Estos datos muestran que en los animales con patología respiratoria el número de macrófagos es mucho mayor al de neutrófilos, esto se puede ver también en el estudio realizado por Collie (1999) y posteriormente en el de Ganter (2016) sobre los lavados broncoalveolares con endoscopio flexible en ovino, en el cual se comprueba que las células mayoritarias son los macrófagos alveolares. No se observa ninguna diferencia entre las distintas patologías analizadas, probablemente debido al bajo número de muestras estudiadas.

Del mismo modo se comprobó si la densidad en las citologías (media 3 en la escala de 0-3 y una desviación típica de 0.78) podía ser o no un indicativo de lesión y para ello se usó la prueba exacta de Fisher. Los resultados mostraron que las variables no estaban relacionadas entre sí, así pues, se concluyó que no se puede relacionar la densidad en las citologías con un tipo concreto de patología.

- **Lavados nasobronquiales**

Las citologías realizadas en los lavados nasobronquiales, revelaron que el recuento medio mediante la cámara de Neubauer fue de 4160.34 ± 5869.57 . Sin embargo, en los primeros animales analizados, al examinar estas citologías al microscopio óptico, se pudo observar que muchas de las células encontradas eran células epiteliales, lo cual nos podía estar indicando que las muestras que estábamos obteniendo con este sondaje no procedían de pulmón. Fue por esa razón que para comprobar si estábamos en pulmón o no decidimos sondar a 5 animales justo antes del sacrificio, dejando la sonda introducida para ver si llegábamos realmente al pulmón y nuestra sorpresa fue que la sonda quedaba enrollada, en todos ellos, al final de las coanas, no accediendo a la tráquea en la mayor parte de las ocasiones. A partir de este descubrimiento, decidimos no sedar a los animales para llevar a cabo este sondaje, ya que al sedarlos dificultábamos el acceso a la tráquea. Con estas mejoras introducidas, los resultados obtenidos fueron también mucho mejores.

Con todo ello, podemos concluir que la realización de estudios citológicos de las muestras obtenidas de los lavados broncoalveolares puede servir para confirmar si las muestras han sido recogidas adecuadamente y si realmente hemos alcanzado el pulmón durante el sondaje.

CONCLUSIONES

1. Los lavados bronquiales se muestran como una técnica fácil y segura para aplicar a nivel de campo y a un elevado número de animales, siendo los lavados nasobronquiales más rápidos de realizar que los traqueobronquiales y menos traumáticos para el animal, aunque es necesario tener cierta pericia en la realización de esta técnica para obtener una muestra con suficiente calidad diagnóstica.
2. En la exploración respiratoria de los animales analizados el tipo de afección más frecuentemente encontrada fue la bilateral y productiva que la padecieron un 33,96% de los animales estudiados.
3. Las enfermedades respiratorias más comúnmente encontradas fueron el complejo respiratorio ovino y la enfermedad de Maedi Visna en su forma respiratoria. Además, la correlación entre el diagnóstico clínico y la lesión encontrada en necropsia fue de un 75,5%.
4. Los resultados microbiológicos muestran un 71,4% de aislamientos positivos en las muestras de parénquima pulmonar tomadas durante la necropsia en comparación con el 57,8% de aislamientos positivos en los lavados traqueobronquiales y el 35% de los nasobronquiales.

5. Los principales microorganismos aislados fueron *Pasteurella multocida* y *Trueperella pyogenes*, seguidos de *Mycoplasma ovipneumoniae*. Además, los agentes que muestran mayor correlación entre las muestras obtenidas en los lavados brocoalveolares y las recogidas en pulmón son: *Pasteurella multocida* y *Mycoplasma ovipneumoniae*.
6. Los recuentos citológicos de las muestras obtenidas en los lavados se revelan como una técnica eficaz para detectar si la muestra ha sido bien tomada, ya que la ausencia de células inflamatorias en la muestra es indicativo de que no se ha alcanzado el pulmón. Las células mayoritarias encontradas en estas muestras fueron los macrófagos.

CONCLUSIONS

1. Nasobrochoalveolar lavages are shown as an easy and safe technique to apply in field conditions and in a high number of animals, being faster to perform than the tracheobronchial lavages and less traumatic for the animal, although it is necessary to have some expertise in the realization of this technique to obtain a sample with sufficient diagnostic quality.
2. In the respiratory examination of the analysed animals the most frequently condition found was bilateral and productive that was suffered by a 33.96% of the studied animals.
3. The most commonly respiratory diseases found were ovine respiratory complex and Maedi Visna disease in its respiratory form. In addition, the correlation between the clinical diagnostics and the lesion found at the necropsy was 75.5%.
4. Microbiological results show a 71.4% of positive isolations in lung parenchyma samples collected during necropsy compared with 57.8% of positive isolations in tracheobronchial lavages and 35% in the nasobronchial lavages.
5. The main microorganisms isolated were *Pasteurella multocida* and *Trueperella pyogenes*, followed by *Mycoplasma ovipneumoniae*. In addition, the agents that show greater correlation between the samples obtained in the brocoalveolar lavages and those obtained from injured lungs were: *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma ovipneumoniae*.
6. Cytology counts of bronchoalveolar lavages are revealed as an effective technique to detect if the sample has been well taken, since the absence of inflammatory cells in the sample is indicative of that lung has not been reached. The majority cells found in these samples were macrophages.

VALORACIÓN PERSONAL

Realizando este Trabajo de Final de Grado he podido ampliar mis conocimientos sobre la patología respiratoria y la exploración clínica en ovino, además de esto he podido afianzar dichos conocimientos y muchos más obtenidos durante toda la carrera de Veterinaria.

He podido descubrir lo que significa el mundo de la investigación y que no siempre salen los resultados esperados.

Querría dar las gracias a mis tutores por toda la paciencia y dedicación, a mis padres por su apoyo durante la carrera y además también agradecer a todas las personas que me han ayudado a que este trabajo siguiera adelante.

BIBLIOGRAFÍA

Azizi, S.; Korani, F.S. y Oryan, A. (2013), Pneumonia in slaughtered sheep in south-western iran: pathological characteristics and aerobic bacterial aetiology. *Veterinaria italiana*. Vol 49,109-118

Baird, G.J. & Fontaine, M.C. (2007).Corynebacterium pseudotuberculosis and its role in ovine caseous lymphadenitis.*Journal of Comparative Pathology*.Vol. 173, 179-120.

Benavides, J., González, L., Dagleish, M.y Pérez, V. 2015. Diagnostic pathology in microbial diseases of sheep or goats. *Veterinary Microbiology* 181, 15-26.

Biescas. E.; Jirón. W.; climent. S.; Fernández. A.; Pérez. M.; weiss. D.T.; Solomon.A.y Luján. L.; (2009). AA Amyloidosis Induced in Sheep Principally Affects the Gastrointestinal Tract. *Journal of Comparative Pathology*.Vol. 140, 238-246.

Borobia. M.; De las Heras.M.; Ramos.J.J.; Ferrer.L.M.; lacasta.D.; de Martino.A.; Fernández.A., Loste.A.; Marteles.D.y Ortín.A. (2016). Jaagsiekte sheep retrovirus can research peyer's patches and mesenteric lymph nodes of lambs nursed by infected Mathers. *Veterinary pathology*. Vol. 53(6), 1172-1179

Collie, D.D.D.; Baker, A.; Mauchline, S.; Porteous,D.y McLachlan, G. (1999). Ovine bronchoalveolar lavage cellularity: reproducibility and the effect of multiple repeated lavage. *Research in Veterinary Science*. Vol. 67, 135-138

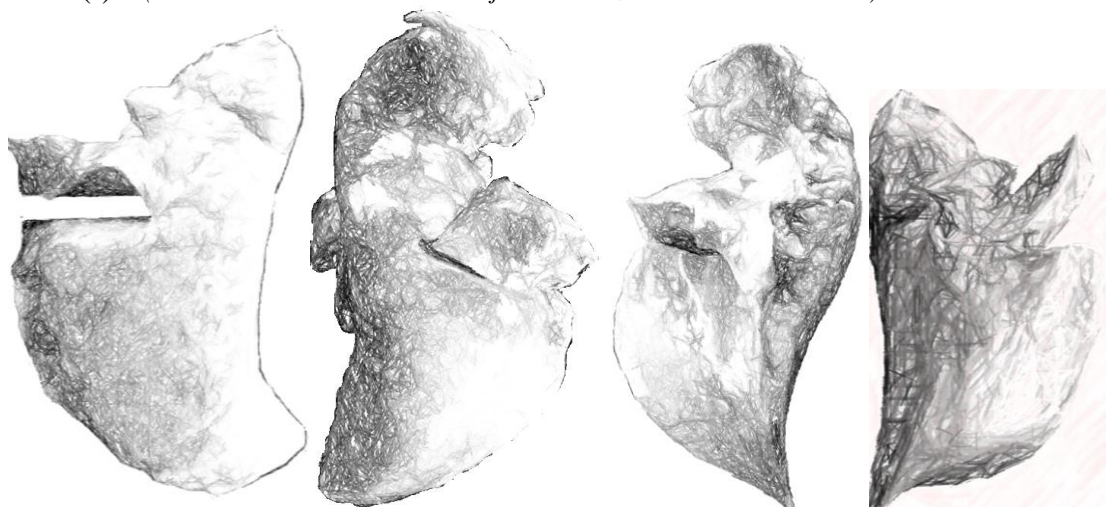
Cousens, C.; Thonur, L.; Imlach, S.; Crawford, J; Sales, J.y Griffiths, D.J. (2009).Jaagsiekte sheep retrovirus is present at high concentration in lung fluid produced by ovine pulmonary adenocarcinoma-affected sheep and can survive for several weeks at ambient temperature. *Research in Veterinary Science*. Vol. 87, 154-156.

- Estevao, S.; Gallardo, A.; Abalos, A.; Jodor, N.; Jensen, O. (2006). *Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad*. Veterinaria Argentina. Vol. 23, 258-278.
- Ferrer, L.M.; García de Jalón, J.A. y De las Heras, M. (2002). *Atlas de Patología Ovina. 2ª edición*. Editorial Servet. Zaragoza. España.
- Ganter, M. (2016) Bronchoalveolar lavage by flexible endoscopy in sheep. *Annual ECSRHM conference*. Freiburg, Germany
- García-Goti M; González L; Cousens C; Cortabarría N; Extramiana AB; Minguijón E; Ortín A; De las Heras M y Sharp JM.(2000) Sheep pulmonary adenomatosis: characterization of two pathological forms associated with jaagsiekte retrovirus. *Journal of Comparative Pathology*. Vol. 122(1):55-65.
- Griffiths, J.M.; Martineau, H. y Cousens, C. (2010). Pathology and Pathogenesis of Ovine Pulmonary Adenocarcinoma. *The Journal of Comparative Pathology*. Vol. 142, 260-283.
- González, J.M.; Bello, J.M.; Rodríguez, M.; Navarro, T.; Lacasta, D.; Fernández, A. y De las Heras, M. (2016). Lam feedlot production in Spain: Most relevant Elath issues. *Small Ruminant research*. Vol. 142, 83-87
- Jorba Cortada, M. (2015). *Principales causas de desecho en el ganado ovino de carne de la provincia de Zaragoza*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.
- Lacasta, D. (2016). Problemas respiratorios en ganado adulto: ¿Cuál es su incidencia real?. *Tierras Ovino*. Nº 16, 30-39.
- Lacasta, D.; González, J.M.; Navarro, T.; Valero, M; Saura, F.; Ramos, J.J.; Ferrer, L.M.; Ortín, A. y Jiménez, C. (2016). Respiratory diseases affecting adult sheep in Spain: relationship between auscultation and lung lesion. *Annual ECSRHM conference*. Freiburg, Germany.
- Martin, D.W. & Aitken, I.D. (2000). *Diseases of Sheep. 3rd edition*. Blackwell Science Ltd. Oxford, United Kingdom.
- Mearns, R., 2009. Post mortem examination of sheep aged over 12 months. *Livestock* 14, 42-49.
- Navarro, T.; Ferrer, L.M.; Ramos, J.J.; Lacasta, D.; Bueso, J.P.; González, J.M. y Catalán, E. (2015). Pseudotuberculosis: ¿Acorta la vida productiva de nuestras ovejas?. *Ficha técnica Zoetis*.
- Ortega, M.E. ; Gonzalez, J.M.; Ramos, J.J.; Ferrer, L.M.; Ruiz de arcaute, M.; Lacasta, D.; Gartzandia, A. y Espada, M. (2017). Estudio de las alteraciones de la tráquea en el ganado ovino: descripción y prevalencia. XLII Congreso nacional Y XVIII Internacional de la sociedad Española de ovinotecnia y caprinotecnia (SEOC). Salamanca. España

- Palmarini, M.; Sharp, J.M.; De las Heras, M.y Fan, H. (1999). Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. *Journal of Virology*. Vol. 73, nº 8, 6964-6972.
- Pinczowski, P., Sanjosé, L., Gimeno, L.; Crespo, H.; Glaria, I.; Amorena, B.; de Andre´s, D.; Pérez, M.; Reina, R.y Luján, L. (2017) Small ruminant lentiviruses in sheep: pathology and tropism of 2 strains using the bone marrow route. *Veterinary Pathology*. Vol. 54(3) 413-424
- Pugh, D.G. (2002). *Sheep and Goat Medicine*. Saunders editors. Philadelphia, United States of America.
- Sánchez, M.C. (2003). *Enfermedades parasitarias del ganado ovino y caprino*. Ediciones Gea. Barcelona, España.
- Sheeham, M.; Markey, B.; Cassidy, D.; Ball, H.; Duane, M.y Doherty, M.L. (2005) New transtracheal bronchoalveolar lavage technique for the diagnosis of respiratory disease in sheep. *Veterinary Record*. Vol 157, 309-313
- Scott, P., Collie, D., McGorum, B.y Sargison, N. (2010). Relationship between thoracic auscultation and lung pathology detected by ultrasonography in sheep. *Veterinary Journal* 186, 53-57.
- Scott, P.R. (2007). *Sheep Medicine*. Manson Publishing Ltd. London, United Kingdom.
- Rowe, H.A; Poxton, I.R y Donachie, W. (2001). Survival of Mannheimia (Pasteurella) haemolytica in tracheobronchial washing of sheep and cattle. *Research in veterinary Microbiology*. Vol 81, 305-314.
- Wäsle, K.; Pospischil, A.; Hässig, M.; Gerspach, C.y Hilbe, M. (2017) The post-mortem examination in ruminants and its possible benefit to ruminant clinical medicine. *Journal of Comparative Pathology*. Vol. 156, 202-216.

ANEXOS

Nº SCOC Nº CROTAL Fecha exploración
 Nº bolo Explotación de origen
 Raza Sexo Edad
 T^a FR. FC. C.C
 Disnea: Ausencia Inspiratoria Espiratoria Mixta
 Secreción Nasal: Ausencia Mucosa Serosa Hemorrágicas/ Unilateral Bilateral
 Deformación Craneal: Ausencia Etmoides Cornete ventral Seno maxilar dcho/izq
 Senos frontales Otros _____
 Tos: Ausencia Productiva Seca/ Fuerte Débil Olor: Positivo/Negativo
 Auscultación: Normal Seca Productiva Prueba Carretilla: Positiva/Negativa
 Ruidos Respiratorios: Ninguno Estertores (*) Ronquidos(O) Sibilancias (/) Roce pleural (-) *(Poner estos símbolos en el dibujo sobre la zona donde se escuchan)*



Diagnóstico presuntivo:

NECROPSIA Código De Necropsia:

Fecha de la Necropsia: Causa Muerte: Muerte Natural Sacrificio

Lesión Vías Altas: Ausencia RCP ANE Rinitis Sinusitis Oestrus Otras

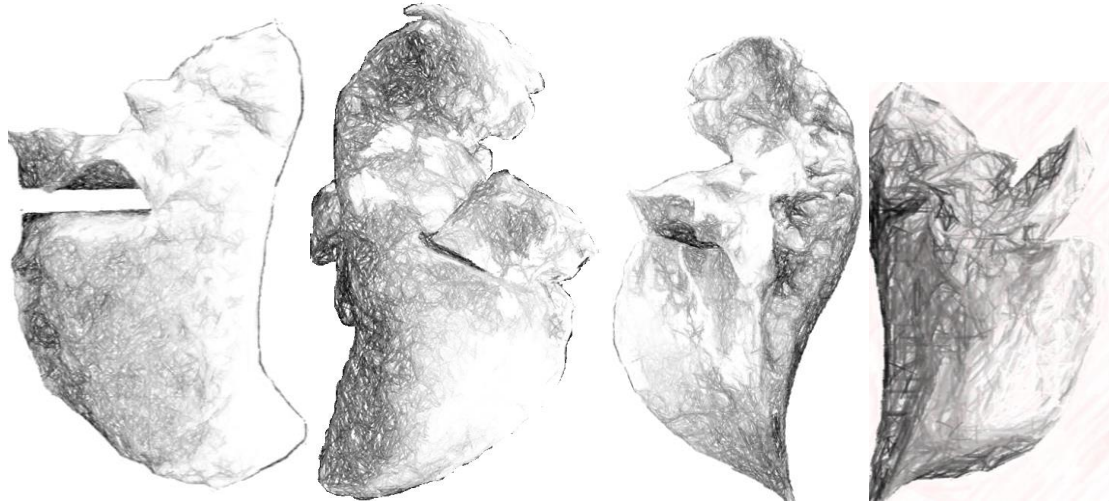
Salida De Fluidos Vías Altas: Sanguinolentos Mucosos Serosos

Traquea: Lesión: Ausencia Traqueitis Hemorragias Aplastamiento Otras

Aplastamiento Traqueal: Ausencia Craneal Medio Caudal

Contenido: Espuma Espuma Sanguinolenta Moco Seroso
 Pulmón: Afección: Ausencia Unilateral Bilateral
 Tipo afección: Ausencia APO(*) Catarral() Fibrinosa() Gangrenosa()
 Intersticial() Pleuritis+ Adherencias() Abscesos() Congestión y edema()
 Otras:

Dibujar en la imagen el sitio concreto de cada una de las lesiones y si no están descritas apuntar que lesión hay y donde



Volumen Pulmón:
 Volumen Sano:
 Volumen Lesión:
 Peso Pulmón:
 Peso Sano:
 Peso Lesión:

Diagnóstico necropsias:

HISTOLOGIA _____ :
 Tipo de lesión: Ausencia APO Catarral Fibrinosa Gangrenosa Granulomatosa
 Intersticial Otras:

MICROBIOLOGIA _____ :
 Microorganismos Encontrados:

Lavado Traqueobronquial Fecha:

Resultados:

Lavados Nasobronquiales: Fecha:

Resultados:

Citología De Lavados: Traqueobronquiales: Macrófagos
 Neutrófilos
 Linfocitos
 Eosinófilos

Nasobronquiales: Macrófagos
 Neutrófilos
 Linfocitos
 Eosinófilos