



Universidad  
Católica de  
Valencia  
San Vicente Mártir

TFG

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN  
VETERINARIA**

Diarreas neonatales en pequeños rumiantes: Prevalencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. *Clostridium* spp. y *Cryptosporidium parvum* en la Comunidad Valenciana.

Alumno: Elena Lindsay Pérez  
Tutor: Sofía Ingesa Capaccioni  
Curso académico: 2018 – 2019



Facultad de Veterinaria  
y Ciencias Experimentales  
Universidad Católica de Valencia  
San Vicente Mártir





ANEXO I

<b>CENTRO</b>	UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA "SAN VICENTE MÁRTIR"
<b>TITULACIÓN</b>	GRADO EN VETERINARIA
<b>TÍTULO DEL TRABAJO FIN DE GRADO</b>	Diarreas neonatales en pequeños rumiantes: Prevalencia de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. y <i>Cryptosporidium parvum</i> en la Comunidad Valenciana.
<b>ALUMNO (Apellidos y Nombre)</b>	LINDSAY PÉREZ, ELENA

AUTORIZACIÓN DEL/ DE LOS DIRECTORES

D/D<sup>a</sup> SOFÍA INGRESA CAPACCIONI, profesor/a del Departamento de Sanidad Animal y Salud Pública, de la Escuela/Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales del campus de Santa Úrsula, AUTORIZA a D/D<sup>a</sup> ELENA LINDSAY PÉREZ, a presentar la propuesta de TRABAJO FIN DE GRADO, que será defendida en castellano (indicar idioma).

Valencia, 12 de Junio de 2019.

LOS/LAS DIRECTORES/AS

Fdo.: D/D<sup>a</sup> Sofía Ingres Capaccioni

SR. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE EVALUACIÓN



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi directora la Dra. Sofía Ingesa la dirección de mi Trabajo fin de grado y todo el apoyo recibido durante el desarrollo y la realización del mismo.

Igualmente, al Dr. Joel Bueso y al Dr. Jose Sansano, por permitirme participar en el proyecto de investigación (Proyecto GV/2017/162) en el que está incluido este Trabajo fin de grado.

A todas las explotaciones ganaderas que me han permitido la toma de muestras para la elaboración del proyecto.

Este proyecto (GV/2017/162) ha sido financiado por la Conselleria de Educación, Investigación, Cultura y Deporte de la Generalitat Valenciana.



ÍNDICE	Páginas
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	1
3. Introducción.....	2
3.1 Importancia del sector de pequeños rumiantes.....	2
3.2 Factores de riesgo de las diarreas neonatales en pequeño rumiante.....	4
3.3 Agentes etiológicos .....	5
3.3.1 <i>Escherichia coli</i> .....	5
3.3.2 <i>Salmonella spp</i> .....	6
3.3.3 <i>Clostridium spp</i> .....	7
3.3.4 <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	8
3.3.5 Otros agentes .....	8
4. Objetivo.....	10
5. Material y métodos .....	10
5.1 Población de estudio.....	10
5.2 Toma de muestras .....	11
5.3 Aislamiento e identificación.....	11
5.3.1 <i>Escherichia coli</i> .....	11
5.3.2 <i>Salmonella spp</i> .....	14
5.3.3 <i>Clostridium spp</i> .....	16
5.3.4 <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	16
5.3.5 Análisis estadístico.....	17
6. Resultados.....	17
6.1 <i>Escherichia coli</i> .....	18
6.2 <i>Salmonella spp</i> .....	21
6.3 <i>Clostridium spp</i> .....	21
6.4 <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	21
7. Discusión.....	22
8. Conclusiones.....	26
9. Bibliografía.....	27
10. Anexos.....	30



## 1. RESUMEN

La diarrea neonatal es uno de los síndromes más comunes y costosos de las explotaciones de pequeño rumiante. La etiología de este síndrome se debe principalmente a la infección por *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, y *Cryptosporidium parvum* de los corderos y cabritos durante los primeros días de vida. A pesar de la importancia de esta patología existen muy pocos estudios sobre los factores de riesgo y prevalencia de los agentes causales implicados. El objetivo de este estudio fue evaluar la prevalencia de dichos microorganismos en las explotaciones de pequeño rumiante de la Comunidad Valenciana. Se analizaron un total de 223 muestras fecales obteniendo una prevalencia del 90,6% para *E. coli* (n=223), 44,3% (n=109) para *C. perfringens* y 1,0% (n=2) para *Salmonella* spp. y 8,8% (n=12) para *C. parvum*. Los resultados confirman que el conocimiento de la epidemiología y factores de riesgo de las infecciones por estos patógenos resulta esencial para mejorar la prevención y el control del síndrome diarreico neonatal en pequeño rumiante y evitar su potencial zoonótico.

**Palabras clave:** *E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium parvum*, prevalencia, síndrome diarreico neonatal, pequeño rumiante.

## 2. ABSTRACT

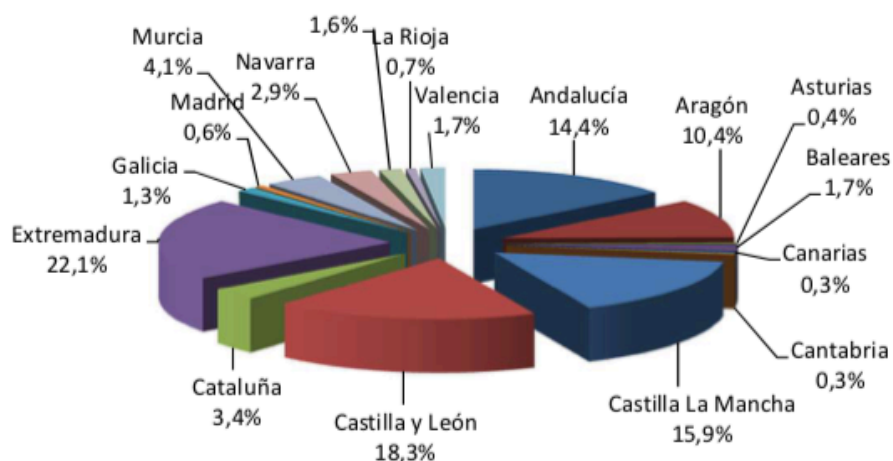
Neonatal diarrheic syndrome remains the most common and costly syndrome at small ruminant farms. The etiology of this syndrome it is mainly due to the infection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Clostridium perfringens*, and *Cryptosporidium parvum* in lambs and goat kids during the first days of life. Despite the magnitude of this pathology, there are very few studies regarding risk factors and prevalence of this agents. The objective of this study was to evaluate the prevalence of these microorganisms at selected small ruminant farms in the Valencian region. The results showed that the prevalence of the pathogens in their fecal samples was 90,6% (n=223) for *E. coli*, 44,3% (n=109) for *C. perfringens*. 1,0% (n=2) for *Salmonella* spp and 8,8% (n=12) for *C. parvum*. These results confirm that the knowledge of the epidemiology and risk factors of infections caused by these pathogens is essential to improve the prevention and control of neonatal diarrhea syndrome in small ruminants and avoid their zoonotic potential.

**Keywords:** *E. coli*, *Salmonella* spp, *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium parvum* prevalence, neonatal diarrhea syndrome, small ruminant.

### 3. INTRODUCCIÓN

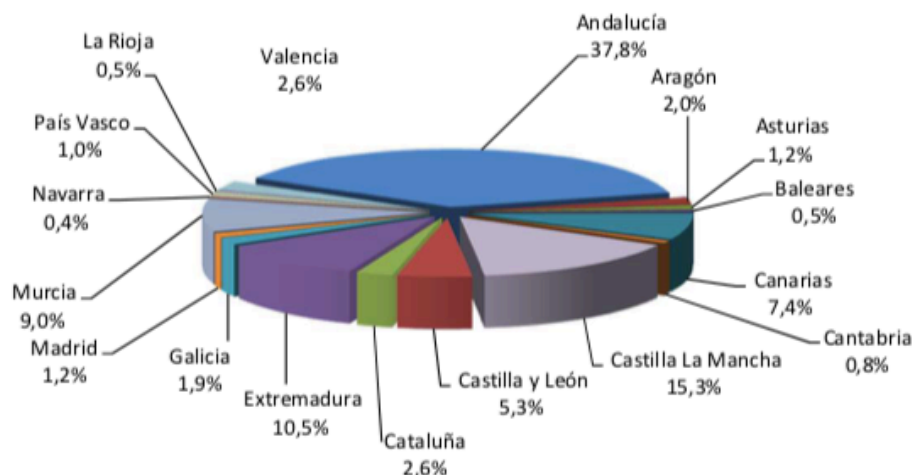
#### 3.1 Importancia del sector de pequeño rumiante

España es el segundo país europeo en censo ovino por detrás el Reino Unido con un censo total de 16.873.685 cabezas y 114.836 explotaciones (MAPAMA 2018). Dentro del territorio español, la Comunidad Valenciana supone el 1,7% del censo ovino nacional (Fig. 1) con un total de 289.327 cabezas y 1392 explotaciones (1) (2). Respecto a la clasificación de las explotaciones en función de la orientación productiva, en la Comunidad Valenciana están registradas actualmente 1.250 explotaciones de aptitud cárnica, 18 de aptitud lechera y 132 en categoría mixta.



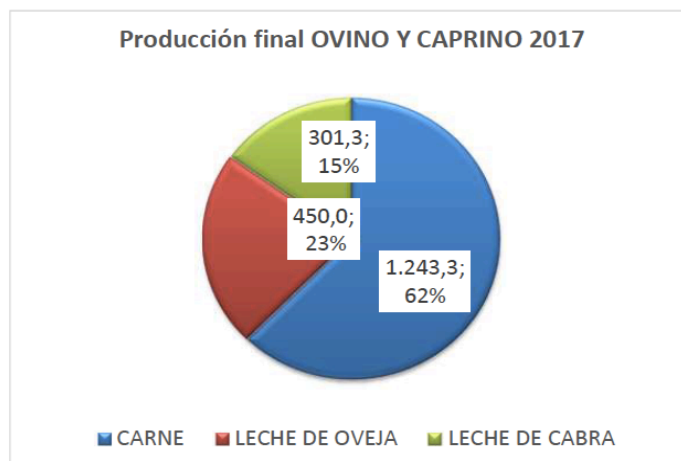
**Figura 1. Distribución del censo ovino en España en 2018 (SITRAN, 2018)**

El número de explotaciones de ganado caprino a nivel nacional es de 77.160, con un censo de 2.929.803 cabezas, siendo el segundo país en censo caprino europeo por detrás Grecia. Dentro del territorio español, la Comunidad Valenciana supone el 2,6% del censo caprino nacional (Fig. 2), con un total de 76.869 cabezas distribuidas en 1.183 explotaciones (1) (2).



**Figura 2. Distribución del censo caprino en España (SITRAN, 2018)**

Económicamente, la exportación de ovino en España supone unos ingresos de 290.543.000€ anuales. La carne de caprino tampoco se queda atrás, sumando un total de 136.028.000€ anuales (1). Dentro del total de la producción final por productos de origen ovino y caprino, la carne, leche de oveja y leche de cabra constituyen un 62,0%, 23,0% y 15,0%, respectivamente (1) (Fig. 3). El consumo actual de carne fresca de ovino y caprino en los hogares se sitúa en 68.116 toneladas anuales, siendo Aragón, Castilla y León y Castilla La Mancha las Comunidades Autónomas principales consumidoras (3).



**Figura 3. Producción final de ovino y caprino en 2017 referente al sector cárnico y lechero en España (MAPAMA 2018).**

La principal fuente de ingresos de las explotaciones de ovino y caprino de aptitud cárnica se centra en la venta de cabritos y corderos para engorde o para sacrificio en matadero. En las explotaciones de orientación lechera esta venta supone

un 17,0% de los ingresos totales siendo un pilar esencial en la rentabilidad de las explotaciones (1). Teniendo en cuenta que, de las 1.392 explotaciones de ovino en la Comunidad Valenciana, 1.250 de ellas están especializadas en el sector cárnico, la aparición de brotes diarreicos entre corderos supone grandes pérdidas económicas para el productor. Estas pérdidas se dan por el elevado número de bajas, por pérdidas de la ganancia media diaria, por disminución del rendimiento de los animales, por el aumento del índice de conversión y por aumento del gasto en pienso para alcanzar su peso adecuado (1). Otros gastos añadidos además de los descritos, serían el uso de vacunas, antiparasitarios y antibióticos para el tratamiento de los animales. Además de la importancia económica que le supone a la explotación, cabe destacar la importancia sanitaria de los agentes causales, ya que algunos como *Escherichia coli* o *Salmonella* spp. son potencialmente zoonóticos (4).

### 3.2 Factores de riesgo de las diarreas neonatales en pequeño rumiante

La diarrea en corderos y cabritos se da comúnmente a causa de un complejo multifactorial. Las causas más comunes de diarrea durante el primer mes de vida son bacterias o parásitos presentes en el tracto digestivo de manera habitual que resultan patógenas en condiciones de manejo inadecuadas. Sin embargo, a pesar de los avances en prácticas de manejo y prevención en las explotaciones, la diarrea neonatal sigue siendo el síndrome más común y costoso de las explotaciones de pequeño rumiante (4).

La etiología del síndrome diarreico neonatal está ampliamente estudiada en ganado vacuno, pero actualmente hay pocos estudios sobre la afectación en corderos y cabritos. En España la mayoría de explotaciones de pequeño rumiante son de tipo intensivo, por lo que la problemática de bajas por hipotermia o depredadores se reduce, y entra en juego el aumento de mortalidad de los neonatos por presencia de enfermedades infecciosas, siendo las gastrointestinales las más prevalentes (5). Teniendo en cuenta el impacto sanitario y económico que suponen estas enfermedades, la correcta identificación del agente etiológico sigue siendo esencial para combatir las (4).

Se han identificado diversos factores relacionados con una mayor prevalencia de problemas gastrointestinales, entre los que cabe destacar el calostro. Influye tanto la deficiencia en calidad como en cantidad de calostro recibido (6). Otros factores a tener en cuenta son el tipo de placentación, la breve capacidad de absorción de inmunoglobulinas (g), la predisposición de primíparas con sistemas inmunes menos

desarrollados y el manejo. En neonatos el mayor factor de riesgo de la aparición de cuadros entéricos por salmonelas es la lactancia artificial en manejo intensivo (6). En cuanto al desarrollo de enterotoxemias por *C. perfringens* en ovino destacan, en primer lugar, la baja actividad proteolítica intestinal, bien por parte de presencia de inhibidores de tripsina en el calostro o por baja secreción pancreática, y en segundo lugar la carencia de una microbiota definida en el tracto digestivo del animal neonato (6). Paralelamente, los factores de riesgo más comunes de *Cryptosporidium* spp. son el estado higiénico deficiente de la paridera, la edad de las madres y el número elevado de corderos por granja. Giadinis et al. (2008) demostraron en su estudio que en explotaciones con un mayor número de animales existía una mayor probabilidad de contacto entre ellos, por lo que había una mayor necesidad de manejo adecuado.

### 3. 3 Agentes etiológicos

Los agentes etiológicos que más comúnmente afectan al tracto gastrointestinal de los pequeños rumiantes causando diarrea, son agentes que de manera habitual no causan clínica, a menos que se den determinadas condiciones ambientales en las explotaciones ganaderas (6). Entre ellos cabe destacar *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. y *Cryptosporidium* spp. Estos microorganismos, afectan principalmente a animales durante el primer mes de vida (6). También suelen ser frecuentes las infecciones por agentes víricos como *Coronavirus* y *Rotavirus* durante las primeras semanas de vida. La gravedad de las infecciones víricas depende del carácter y la duración de la infección secundaria. Es habitual que la infección vírica favorezca la multiplicación bacteriana, por lo que encontraríamos infecciones mixtas por ambos tipos de virus y sinergia con infecciones bacterianas en particular *E. coli* (6).

#### 3. 3. 1. *Escherichia coli*

*E. coli* es un bacilo Gram negativo, de la Familia *Enterobacteriae* de mediano tamaño entre 0,5 a 2,5 micras, anaerobio facultativo, móvil mediante flagelos peritricos, fermentador de glucosa, oxidasa negativo y catalasa positivo. Este agente se encuentra de forma habitual en el tracto digestivo, tanto en el intestino delgado como en el intestino grueso de todos los mamíferos, siendo más común en carnívoros y omnívoros que en rumiantes. Se excreta por heces y es capaz de sobrevivir en ellas durante meses (6). Es una de las causas más frecuente de diarrea en los corderos neonatos, y puede

alcanzar mortalidades del 100% tanto en cabritos como en corderos durante las dos primeras semanas de vida (5). Los síntomas de la colibacilosis en ruminantes varían según el tipo de cepa. Podemos encontrar las cepas enterotoxigénicas (ECET), las cepas enteroinvasivas (ECEI), las cepas enteropatógenas (ECEP) y las cepas verotoxigénicas (ECVT). Las cepas más comunes en corderos son las enteropatógenas (ECEP). La patogenicidad del tipo de *E. coli* presente está relacionada con la presencia de fimbrias y la producción o no de enterotoxinas. Las infecciones se caracterizan por la aparición de un cuadro diarreico acompañado de pérdida de peso y apatía (6). Las colibacilosis se pueden clasificar en función del cuadro clínico en tres formas: la forma diarreica, la forma septicémica y la forma endotóxica (8).

La prevalencia de cepas patógenas de *E. coli* en España es de un 26,0% en corderos y un 22,0% en cabritos (5). En otros países como Suecia se ha descrito que la principal causa de mortalidad por septicemia en corderos es a causa de *E. coli*, suponiendo un 65,0% del total de muertes por septicemia. Señalan que en casos de mortalidad neonatal sin diferenciación de origen el 14,0% se atribuye a *E. coli* siendo por tanto un agente prevalente y drásticamente implicado en el aumento de bajas en las explotaciones (9).

### **3. 3. 2. *Salmonella* spp.**

*Salmonella* es un bacilo Gram negativo de la familia de las Enterobacterias, es anaerobio facultativo, intracelular invasivo asociado a la flora intestinal. Suele estar presente de manera habitual en el tracto digestivo, en particular de aves y ganado vacuno, y se elimina por heces contaminando el medio ambiente. Puede permanecer 40 días en el suelo, y hasta 30 meses en heces secas, y sobrevive mejor los meses cálidos que los meses fríos. Habitualmente la infección se da por vía oral, bien por ingesta de agua o piensos contaminados. Dentro de las especies de salmonellas la mayoritaria en todos los casos es *S. enterica* Typhimurium (10). En heces aparece con mayor proporción en las de ovino que en las de bovino (11). Es estable a temperaturas de entre 7 a 45°C por lo que en condiciones sanitarias deficientes pueden contaminar los alimentos, siendo la segunda causa de toxiinfecciones alimentarias en España y la Unión Europea. (12) (13). La infección por *Salmonella* spp. cursa con diarrea de tipo mucoso, y de aspecto líquido y maloliente. Una de las principales complicaciones de las infecciones por *Salmonella* spp. suele ser la septicemia generalizada, muy común en terneros,

corderos y potros. Los síntomas incluyen depresión y fiebre elevada seguidos de altos picos de mortalidad los dos días siguientes a la aparición de la clínica del animal (14).

La prevalencia de *Salmonella* spp. como agente causal de diarrea neonatal en pequeño rumiante está actualmente poco estudiada. Por lo general, en España se estima que la prevalencia en las explotaciones suele ser baja, situándose entre un 5,0 y un 8,0% (10). Algunos autores describen prevalencias de hasta el 14,4% en corderos (15).

### **3. 3. 3. Clostridium spp.**

Los clostridios son bacilos Gram positivos, en su mayoría anaerobios, catalasa y oxidasa negativos, y productores de esporas presentes en el suelo, el tracto digestivo de los animales y las heces. Dentro de los clostridios enteropatógenos encontramos principalmente a *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*). Se distinguen cinco tipos de *C. perfringens*: A, B, C, D y E. Los tipos B, C y D son de particular importancia en animales domésticos, produciendo cuatro toxinas (alfa, beta, épsilon e iota) (6). En pequeños rumiantes destaca la importancia de *C. perfringens* tipo B y D. La disentería de los corderos es causada por *C. perfringens* tipo B, pudiendo alcanzar mortalidades de hasta el 30% (6). La enterotoxemia más común en corderos jóvenes es causada por *C. perfringens* tipo D pudiendo alcanzar prevalencias del 26% (16). Los corderos suelen afectarse en la primera semana de vida y en algunos casos mueren súbitamente sin mostrar signos clínicos. Se cree que la alta susceptibilidad de estos animales es debida a la ausencia de microorganismos competentes en el tracto digestivo y una baja actividad proteolítica intestinal (17). Sin actividad proteolítica la toxina beta se ve potenciada y produce la enfermedad. Se han descrito enterotoxemias causadas por *C. perfringens* tipo B en potros recién nacidos, terneros y en cabras adultas. (17).

La prevalencia de *Clostridium* spp. en España se sitúa entre un 8,0 y 10,0% en cabritos recién nacidos. La baja prevalencia en corderos se cree que se debe a la vacunación sistemática (5).

### 3. 3. 4 *Cryptosporidium parvum*

Dentro de los coccidios que más comúnmente afectan a los pequeños rumiantes encontramos *Cryptosporidium* spp. La criptosporidiosis está mayoritariamente causada por *Cryptosporidium parvum*, un pequeño parásito apicomplejo de la familia *Cryptosporidiidae* que infecta al tracto digestivo de los vertebrados. De las especies de *Cryptosporidium* descritas específicas para mamíferos encontramos *C. parvum*, *C. muris*, *C. felis* y *C. wrairi*. Las infecciones en humanos son en su amplia mayoría causadas por *C. parvum* provienen de vacuno y ovino, por lo que se trata de un patógeno zoonótico que en ambos hospedadores causa fuertes diarreas (7). En animales afecta a corderos y cabritos de 4 a 15 días de edad, produciendo una importante diarrea, deshidratación y alteración electrolítica del organismo, que en muchas ocasiones acaba produciendo la muerte de los animales (7). El principal síntoma de *Cryptosporidium* spp. en rumiantes neonatos es la aparición de picos de diarrea entre el rebaño (18). El parásito es capaz de invadir los enterocitos apicales produciendo su atrofia, favoreciendo la fusión de las vellosidades intestinales y la pérdida de enzimas digestivas del borde luminal. La atrofia de las vellosidades impide la absorción de los azúcares favoreciendo el desarrollo de una diarrea. Esta diarrea se caracteriza generalmente por un color amarillento con gran mucosidad, y suele ir acompañada de depresión, anorexia y dolor abdominal.

La prevalencia de *Cryptosporidium* spp. es con diferencia la más elevada de los agentes causales de diarrea neonatal. Algunos autores hablan de prevalencias de hasta un 83,3% en cabras y un 76,0% en cabritos. (7). La infección por *C. parvum* puede afectar tanto a corderos como a ovejas adultas, aunque los corderos destetados son los que presentan un mayor riesgo. También se ha observado que existe un mayor número de casos en los meses de otoño (7). Es común que la clínica se complique por la aparición de otros patógenos como *Rotavirus*, *Coronavirus*, *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Giardia* spp. (19).

### 3. 3. 5 Otros agentes

Otra coccidiosis muy común en ovino es la causada por *Eimeria* spp. (20). Dentro de las especies de *Eimeria* spp. que parasitan al ganado ovino las más patógenas encontramos a *E. ovinoidalis* y *E. crandalis* (21). Estos parásitos provocan aumento de la mortalidad, reducción del bienestar de los animales y una disminución de la producción considerable. Los signos clínicos incluyen dolor abdominal, anorexia, diarrea con o sin

hemorragia, pérdida de peso y disminución de la velocidad de crecimiento (20). Las coccidiosis ocurren con mayor frecuencia en explotaciones intensivas en las que los animales se encuentran en espacios reducidos donde el contacto con las heces puede ser mayor (21). Los ooquistes de *Eimeria* spp. son capaces de resistir varios meses en lugares húmedos sin presencia de luz solar en particular en zonas comunes como los comederos, bebederos o las camas donde pueden llegar a concentrarse un número elevado de oosquistes. Los factores que pueden influenciar la gravedad de la infección por *Eimeria* spp. son infecciones secundarias bacterianas víricas o parasitaria, los cambios bruscos de dieta y las deficiencias minerales o vitamínicas de la misma (21). Dependiendo de la especie el período de prepatencia varía de 2 a 3 semanas. La enfermedad clínica generalmente se observa en corderos jóvenes con inicio de los síntomas a las 4 a 6 semanas de vida. (22). La prevalencia de *Eimeria* spp. varía según regiones geográficas y tipos de animales. Estudios realizados en Australia en ovejas hablan de prevalencias de un 18,0% mientras que en Polonia la prevalencia en corderos puede alcanzar hasta un 85,0% del ganado (22) (23).

Otro parásito a destacar es *Giardia* spp. Este protozoo parasitario del sistema gastrointestinal está ampliamente distribuido por el mundo (24). Los corderos infectados suelen desarrollar la enfermedad de manera crónica en muchas ocasiones siendo desapercibida. Los signos clínicos se asocian con heces malolientes con formas anómalas, diarrea, disminución de peso y bajos rendimientos de la canal a la hora del sacrificio. (24)

Por último, otros dos agentes a tener en cuenta como posibles causantes o agravantes de diarrea neonatal en pequeño rumiante son *Rotavirus* y *Coronavirus*. Los *Rotavirus* (RV) son los principales patógenos entéricos en humanos y gran variedad de especies animales (25). El *Rotavirus* es miembro de la familia *Retroviridae*, género dividido en cinco especies: *Rotavirus A*, *Rotavirus B*, *Rotavirus C*, *Rotavirus D* y *Rotavirus E*. En rumiantes las especies más comunes son RVA, RVB y RVC (25). Los síntomas clínicos varían desde una infección asintomática hasta muerte aguda por diarrea debido a una grave deshidratación del animal u otras complicaciones derivadas (25). La prevalencia de *Rotavirus* en pequeño rumiante en España es bastante baja, algunos autores hablan de prevalencias del 2,0% (5).

#### 4. OBJETIVO

El objetivo principal de este estudio fue determinar la prevalencia de *Salmonella* spp., *E. coli*, *Clostridium* spp., y *C. parvum* en las explotaciones de ovino y caprino de la Comunidad Valenciana.

#### 5. MATERIAL Y MÉTODOS

##### 5.1 Población de estudio

Se estudiaron un total de 10 explotaciones de pequeño rumiante distribuidas a lo largo de las tres provincias que forman la Comunidad Valenciana, de las cuales cinco pertenecen a la provincia de Valencia, dos a Castellón y dos a Alicante (Figura 4). Con respecto a la especie, cuatro de ellas son puramente de ovino, dos de caprino y en las otras tres explotaciones restantes encontramos tanto ovino como caprino conviviendo en conjunto. Las razas varían desde indeterminada (Intederm.) hasta razas concretas como son la oveja Lacaune o la cabra Murciano-granadina (MG). Con respecto a la orientación de las explotaciones, cuatro de ellas son de aptitud cárnica, cuatro de ellas son de aptitud leche mientras que la última explotación restante posee ambas aptitudes. En censo de las explotaciones se ha dividido en categoría grande, mediano y pequeño. Otro dato de interés recopilado es el tipo de lactancia de las crías de pequeño rumiante. En seis de ellas utilizan lactancia natural y en tres de ellas utilizan lactancia artificial (Anexo I).



Figura 4. Fotografía de la explotación caprina de Aspe. Fuente: Propia.

## 5.2 Toma de muestras

A la hora de realizar la toma de muestras se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones generales. En primer lugar, debían ser muestras de animales con presencia o apariencia de padecer diarrea profusa o media, en segundo lugar, la recogida debía ser de la forma más aséptica posible, evitando así la contaminación de la muestra. Otra condición a tener en cuenta fue que la recogida de las muestras debía realizarse antes de cualquier tratamiento antibiótico reciente ya que podría dificultar el diagnóstico del agente. Las muestras de heces para el cultivo bacteriano se recogieron de forma individual en cada animal mediante la utilización de dos hisopos estériles (Cary Blair transport sterile swabs, DELTALAB®). Además, se obtuvo una muestra de material fecal directamente del recto del animal.

## 5.3 Aislamiento e identificación

### 5.3.1 *Escherichia coli*

El aislamiento de *E. coli* se realizó mediante siembra de las muestras de heces en agar MacConckey en triple estría (Figura 5). Este medio permite el aislamiento de bacterias Gram negativas, principalmente *Enterobacterias* y *Salmonella* spp., ya que contiene sales biliares y cristal violeta que actúan como inhibidores del crecimiento de bacterias Gram positivas. También es diferencial ya que contiene un indicador rojo neutro que revela la degradación de la lactosa, pudiendo así dividir las bacterias en dos grupos; fermentadoras de lactosa (*Enterobacterias*) y no fermentadoras de lactosa (17).

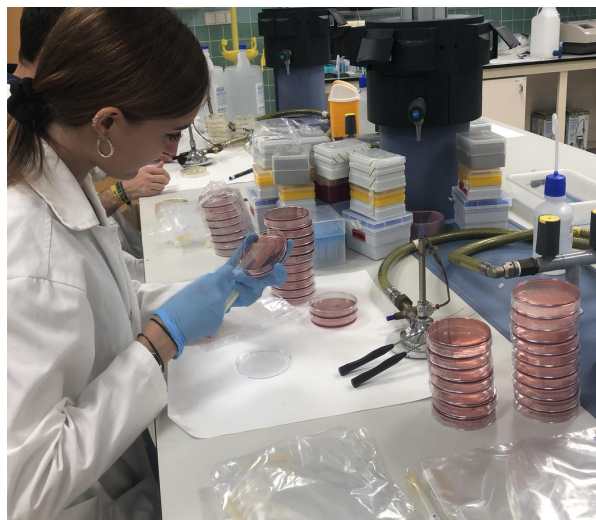


Figura 5. Siembra de las muestras en agar MacConckey. Fuente: Propia.

Las muestras se incubaron 24 horas a una temperatura de 37°C. Tras la incubación se examinaron los cultivos y se transfirió una colonia sospechosa a partir de cada muestra a una placa de Agar Nutritivo mediante siembra en triple estría, para su identificación bioquímica. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas (26). La identificación bioquímica del microorganismo se llevó a cabo mediante la prueba analítica BBL Crystal®. La prueba BBL Crystal® es un método de análisis diferencial de bacterias mediante una serie de pruebas bioquímicas. Este método de identificación en miniatura utiliza sustratos convencionales, fluorogénicos y cromogénicos para la diferenciación de los distintos microorganismos. El sistema del BBL Crystal® consta de tres partes. Una tapa, una base y unos tubos con fluido de inóculo. La tapa Contiene 29 sustratos deshidratados y un control fluorescente en las puntas de las púas de plástico. La base consta de 30 pocillos donde se darán lugar las reacciones enzimáticas. Es importante señalar que esta prueba nos indica el género y especie bacteriana pero no la cepa. Las placas de BBL Crystal® se incubaron en la estufa a 37°C durante 24h (Figura 6).



**Figura 6. Siembra de las muestras en placas de Agar MacConckey.**  
**Fuente: Propia.**

Tras la incubación se realizó la lectura e interpretación de los resultados (Figura 7). De esta forma se obtuvo un código aplicable a una base de datos que nos permitió identificar el género y especie de la bacteria aislada, así como su biotipo gracias al software de identificación BD BBL™ Crystal™ MIND (Figura 8).



Figura 7. Lectura de los pocillos del kit de BBL Crystal. Fuente: propia.



Figura 8. Hoja de anotación de resultados. Fuente: Microbiologiaiit.es

De forma paralela se llevó a cabo la prueba de la oxidasa y del indol, necesarias para la identificación de las bacterias aisladas. En el caso de tratarse de *E. coli* estas pruebas dan resultados indol positivo y oxidasa negativo (Figura 9 y 10).

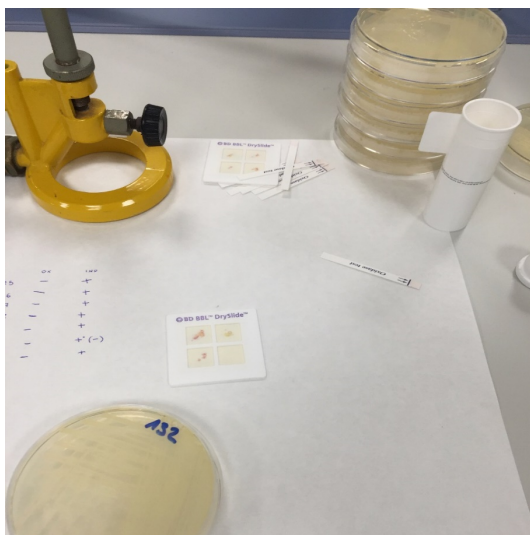


Figura 9. Prueba del indol. Fuente: Propia

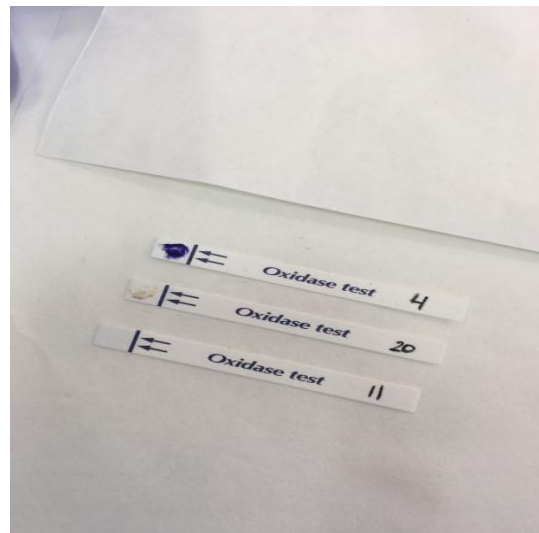


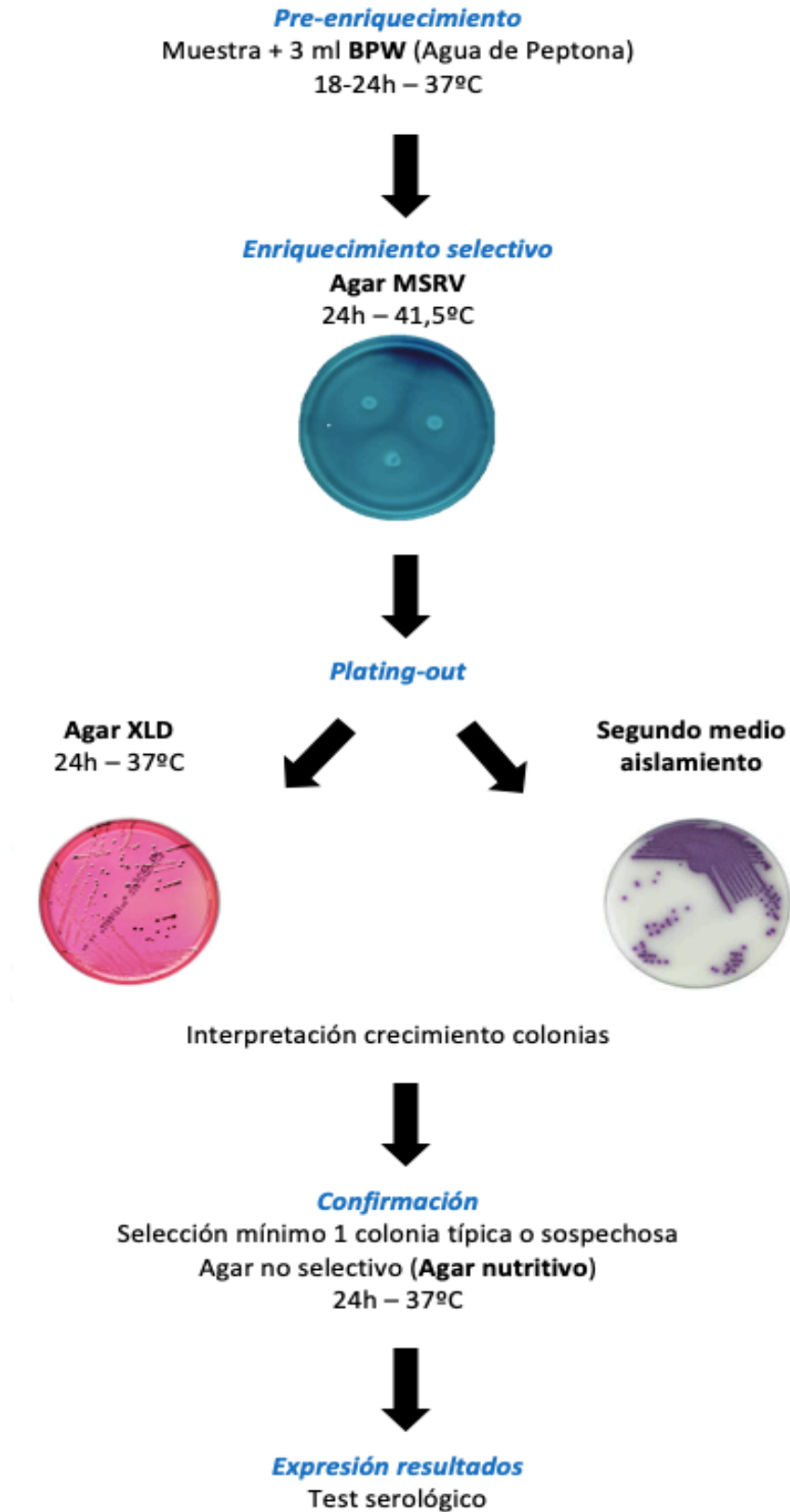
Figura 10. Prueba de la oxidasa. Fuente: Propia

### 5.3.2 *Salmonella* spp.

El aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. se realizó según las indicaciones de la Norma UNE-EN ISO 6579 (Esquema 1) (27). En primer lugar, se realizó un pre-enriquecimiento no selectivo de la muestra en agua de peptona mediante dilución 1:10, y se incubó a a 37°C durante 18-20 horas. El segundo paso consistió en un enriquecimiento selectivo en medio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV). El MSRV es un medio destinado a la detección rápida de *Salmonella* spp. en un entorno donde pueda presentar su motilidad. A partir del contenido en los tubos con agua de peptona ya pre-enriquecidos, se inocularon 100 µL del cultivo obtenido en agua de peptona a una placa de agar MSRV (Figura 11). Las placas se incubaron 48 horas a 41,5°C (27). Tras la incubación las muestras se transfirieron a dos medios selectivos: Agar XLD y Chromo *Salmonella*. Este último, es un medio cromogénico selectivo y diferencial donde las colonias de *Salmonella* spp. crecen de color púrpura intenso. Tanto el Agar XLD como el segundo agar se incubaron durante 24 horas a 37°C. La identificación de las colonias sospechosas se realizó mediante pruebas bioquímicas (BBL Crystal®).



Figura 11. Cultivo en medio Rappaport-Vassiliadis (MSRV). Fuente: propia.



Esquema 1. Identificación *Salmonella* spp. en base a la Norma UNE-EN ISO 6579. Fuente: Propia.

### 5.3.3 *Clostridium* spp.

El aislamiento de *Clostridium* spp. se realizó en Agar TSN (Tryptone Sulfite Neomycin). Este medio de cultivo selectivo requiere condiciones de anaerobiosis para el correcto crecimiento bacteriano (29). El procedimiento se basó en la inoculación de la muestra en el medio e incubación en anaerobiosis a 46°C durante 24 horas. Tras la incubación se valoró la presencia o ausencia de una coloración negruzca, indicativa del crecimiento de *Clostridium* spp. (Figura 12).



Figura 12. Crecimiento de *Clostridium* spp. en Agar TSN tras incubación. Fuente: Propia.

### 5.3.4 *Cryptosporidium parvum*

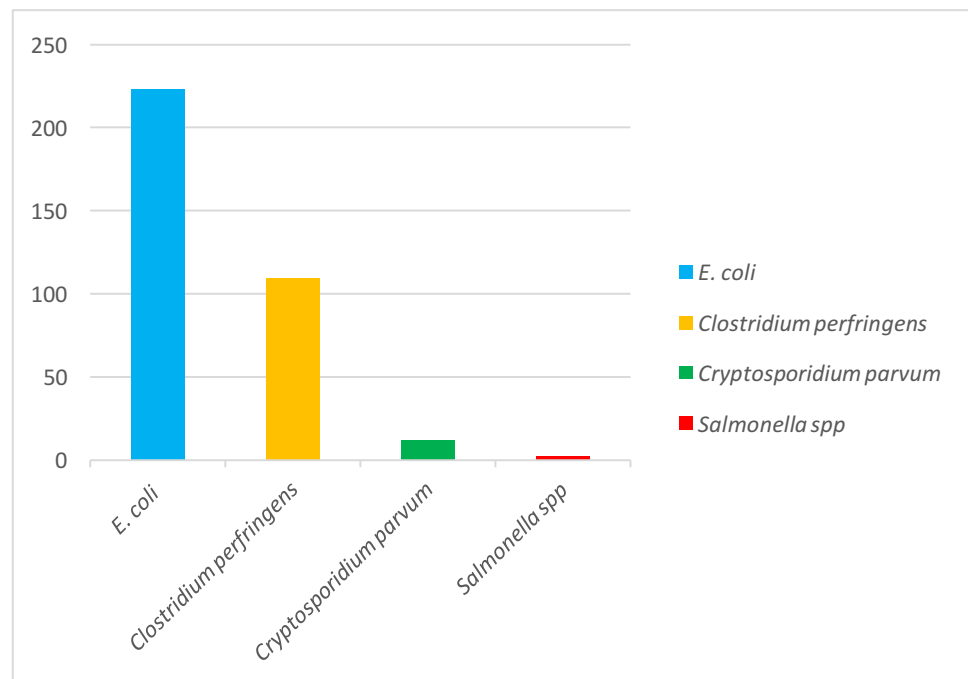
La identificación de *Cryptosporidium* spp. se basó en la utilización de la técnica de inmunofluorescencia directa mediante el kit Merifluor® para *Cryptosporidium parvum*. Siguiendo el procedimiento del kit de tinción se emplearon portas con pocillos excavados en los que se depositaron un control positivo, un control negativo y la muestra de heces. Se dejaron secar al aire unos 30 minutos, se añadió el conjugado con anticuerpos anti-*Cryptosporidium* marcados con isotiocinato de fluoresceína junto con el colorante de contraste. Se incubaron 30 minutos en oscuridad y una vez lavada la preparación se observó junto con la solución de montaje al microscopio de fluorescencia. Se consideraron positivas todas las muestras en las que se observaron formas esféricas redondeadas con coloración verde fluorescente.

### 5.3.5 Análisis estadístico

Para medir diferencias entre los grupos edad y especie en función de la prevalencia de *E. coli*, *Clostridium*, *Salmonella* y *C. parvum* se realizó un Test Exacto de Fisher utilizando el software R-Project (R Core Team, 2013). Se asumieron diferencias significativas con un p-value  $\leq 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

Se analizaron un total de 246 animales de los cuales 156 correspondieron a la especie ovino y 90 a la caprina. Del total de las 246 muestras analizadas, 223 (90,6%) resultaron positivas a *E. coli*, 109 (44,3) fueron positivas a *Clostridium spp.*, 2 (1%) fueron positivas a *Salmonella spp.*, y 12 (8,8%) fueron positivas a *Cryptosporidium parvum* (Gráfica 1 y Tabla 1).



Gráfica 1. Distribución del número de muestras positivas por agente etiológico.

**Tabla 1. Prevalencia de los agentes etiológicos.**

Agente etiológico	Nº positivas	Prevalencia (%)
<i>E. coli</i>	223	90,6%
<i>Clostridium</i> spp.	109	44,3%
<i>Salmonella</i> spp.	2	1,0%
<i>Cryptosporidium parvum</i>	12	8,8%

### 6.1 *Escherichia coli*

Del total de las 246 muestras analizadas 223 fueron positivas a *E. coli*. Esto supone una prevalencia general del 90,6% (Tabla 1). De los 156 corderos y 90 cabritos analizados, el 88,5% (n=138) y el 94,4% (n=85) resultaron positivos a *E. coli*, respectivamente (Tabla 2). En cuanto a las edades, el 89,2% de las muestras se identificaron en animales menores de una semana de edad, el 92,8% en animales entre 2 y 3 semanas de edad y el 90,0% en animales mayores de tres semanas (Tabla 3). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en función de la especie ni de la edad de los animales.

**Tabla 2. Prevalencia de los agentes estudiados en función de la especie.**

	Ovino		p-value	Caprino		p-value
	n	N		n	N	
<i>E. coli</i>	138 (88,5%)	156	1	85 (94,4%)	90	0,172
<i>Clostridium</i> spp.	33 (21,2%) <sup>a</sup>	156	1	76 (84,4%) <sup>b</sup>	90	9,22 e <sup>-23</sup>
<i>Salmonella</i> spp.	1 (0,8%)	156	1	1 (1,1%)	90	1
<i>C. parvum</i>	11 (10,3%)	107	1	1 (3,3%)	30	0,463

n: número de muestras positivas

N: Total de muestras analizadas

<sup>a, b</sup> Diferencias estadísticamente significativas (p-value≤0,05)

**Tabla 3. Prevalencia de los agentes estudiados en función de la edad.**

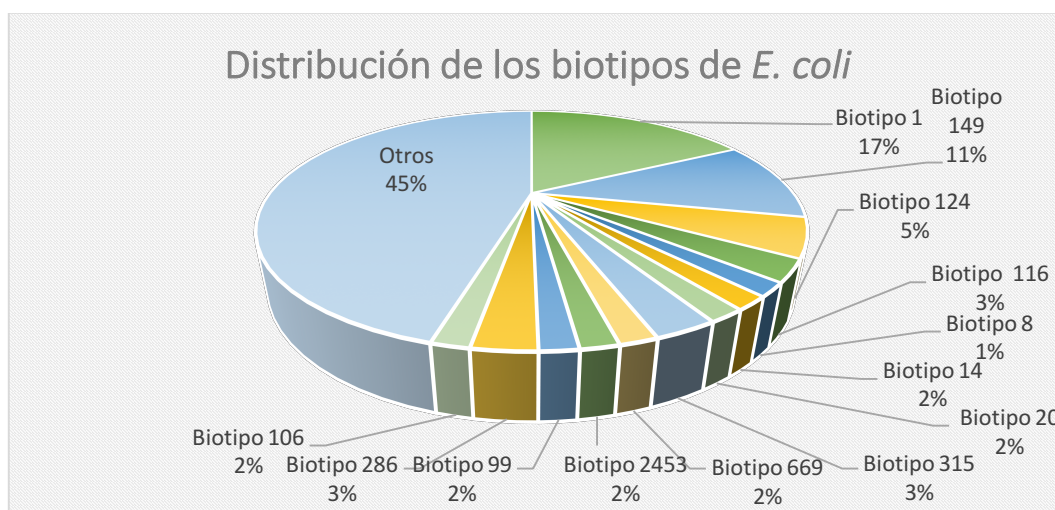
	1 semana		p-value	2 – 3 semanas		p-value	>3 semanas		p-value
	n	N		n	N		n	N	
<i>E. coli</i>	91 (89,2%)	102	0,451	78 (92,8%)	84	1	54 (90,0%)	60	0,556
<i>Clostridium</i> spp.	39 (38,2%) <sup>a</sup>	102	3,89e <sup>-10</sup>	70 (83,3%) <sup>b</sup>	84	5,20e <sup>-10</sup>	0 (0,0%) <sup>c</sup>	60	3,06e <sup>-10</sup>
<i>Salmonella</i> spp.	0 (0,0%)	102	0,203	2 (2,4%)	84	1	0 (0,0%)	60	0,510
<i>C. parvum</i>	4 (7,8%)	51	1	2 (6,9%)	29	0,748	6 (3,5%)	58	0,713

**n:** número de muestras positivas

**N:** Total de muestras analizadas

<sup>a, b, c</sup> Diferencias estadísticamente significativas (p-value≤0,05)

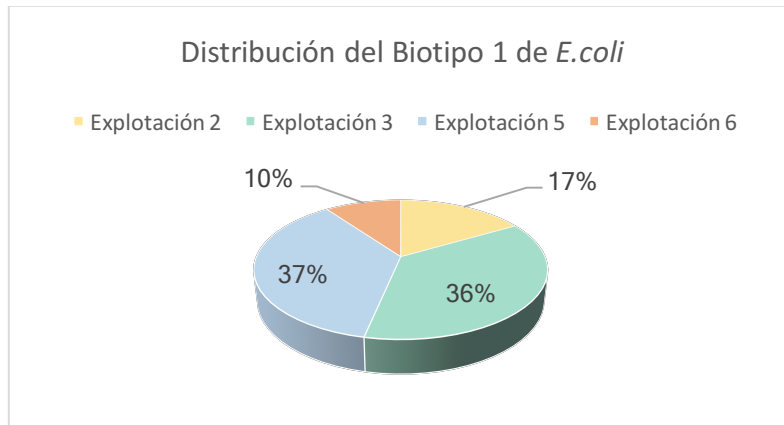
Del total de muestras recogidas para la identificación de *E. coli* sólo se consiguió caracterizar el biotipo en 173 de ellas. Una vez obtenidos los datos se agruparon según biotipos bacterianos y se obtuvieron un total de 58 (Gráfica 2).



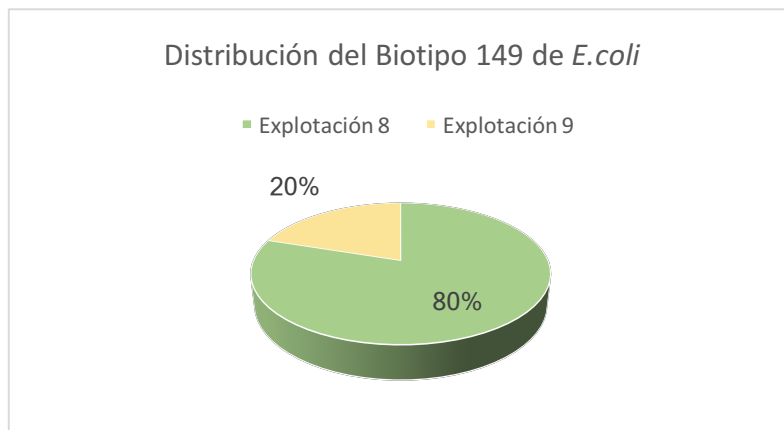
**Gráfica 2. Distribución de los biotipos de *E. coli*.**

Tras la clasificación, el biotipo mayoritario fue el 1 seguido del 149 y del 124, suponiendo un 17,0%, un 11,0% y un 5,0%, respectivamente (Gráfica 2). Un 45,0% del total de biotipos identificados se agruparon en la categoría de *otros*, donde se incluyeron biotipos identificados en una y dos muestras en exclusividad. Agrupando los

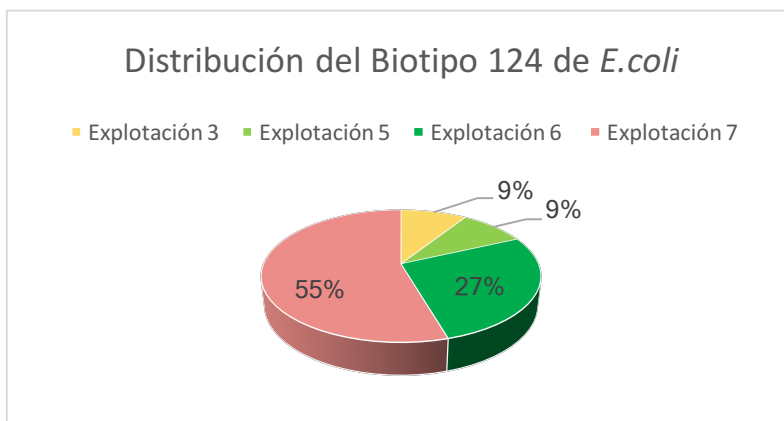
biotipos más comunes según explotaciones en los tres casos mayoritarios los biotipos se localizaban repetidamente solo en ciertas explotaciones (Gráfica 3, 4 y 5).



**Gráfica 3. Distribución del Biotipo 1 en función de las explotaciones.**



**Gráfica 4. Distribución del Biotipo 149 en función de las explotaciones.**



**Gráfica 5. Distribución del Biotipo 124 en función de las explotaciones.**

### 6.2 Resultados de *Salmonella* spp.

Del total de las 246 muestras 2 fueron positivas a *Salmonella* spp. lo que supone un 1,0% de prevalencia (Tabla 1). De los 156 corderos y 90 cabritos analizados, el 0,8% (n=1) y el 1,1% (n=1) resultó positivo a *Salmonella*, respectivamente (Tabla 2). Ambas muestras pertenecían a animales entre 2 y 3 semanas de edad (Tabla 3). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en función de la especie ni de la edad de los animales.

### 6.3 Resultados de *Clostridium* spp.

Del total de las 246 muestras 109 fueron positivas a *Clostridium perfringens*. Este valor supone un 44,3% de prevalencia (Tabla 1). De los 156 corderos y 90 cabritos analizados, el 21,2% (n=138) y el 84,4% (n=85) resultó positivo a *Clostridium perfringens*, respectivamente (Tabla 2). Por edades, el 35,8% de las muestras se aislaron en animales de una semana de edad y el 64,2% restante en animales de edades entre 2 y 3 semanas (Tabla 3). Se hallaron diferencias estadísticamente significativas en función de la especie y de la edad de los animales.

### 6.4 Resultados de *Cryptosporidium parvum*

El análisis de *C. parvum* sólo se pudo realizar en 137 de las 246 muestras tomadas. Del total de muestras analizadas sólo 12 muestras resultaron positivas, representando un 8,8% de la prevalencia del agente (Tabla 1). De los 107 corderos y 30 cabritos analizados, el 10,3% (n=11) y el 3,3% (n=1) resultó positivo a *C. parvum*, respectivamente (Tabla 2). Por edades, el 7,8% de las muestras se aislaron en animales de una semana de edad y el 6,9% restante en animales de edades entre 2 y 3 semanas, y el 3,5% en animales mayores de 3 semanas (Tabla 3). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en función de la especie ni de la edad de los animales.

## 7. DISCUSIÓN

La diarrea en corderos y cabritos es una de las enfermedades más comunes del ganado ovino y caprino. Supone también una de las principales causas de pérdidas económicas para el ganadero, sobre todo en las explotaciones de orientación cárnica en las que la principal fuente de ingresos es la venta de cabritos y corderos (4). Por ese motivo, resulta esencial una correcta identificación del agente que origina estos brotes, para poder establecer un correcto tratamiento y exitosa prevención (4). Sin embargo, esto resulta a veces complicado, ya que la etiología de este síndrome es compleja y están involucrados diversos agentes infecciosos. Además, la etiología y prevalencia de estos agentes se ha estudiado ampliamente en ganado vacuno, pero hasta el momento pocos estudios se han realizado en pequeño rumiante.

En corderos y cabritos, los microorganismos más prevalentes son *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *Rotavirus*, y *Cryptosporidium parvum*, aunque *Clostridium perfringens* y *Salmonella* spp. también se cree que juegan un papel importante. *E. coli* se encuentra presente de manera habitual en el tracto gastrointestinal de la gran mayoría de mamíferos (6). La patogenicidad de *E. coli* depende de la presencia o ausencia de diversos factores. Dentro de estos factores encontramos el antígeno K, el lípido A o endotoxina, las adhesinas, las hemolisinas, los sideróforos, las enterotoxinas y las verotoxinas (6). Las cepas de *E. coli* se pueden agrupar en cuatro grandes grupos según su patogenicidad: cepas enterotoxigénicas (ECET), enteroinvasivas (ECEI), enteropatógenas (ECEP) y enterohemorrágicas o verotoxigénicas (ECVT). Uno de los serotipos más importantes de las cepas enterohemorrágicas de *E. coli* es el O157. Según autores españoles, la prevalencia de cepas patógenas de *E. coli* en España se sitúa alrededor de un 26,0% en corderos y un 22,0% en cabritos (5). Los resultados del presente estudio indican una prevalencia mucho mayor de este patógeno, con un 85,5% y 94,4% de animales positivos en ganado ovino y caprino, respectivamente, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en función de la especie ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ). No obstante, la prevalencia podría estar sobreestimada ya que no se pudo identificar el serotipo de las cepas aisladas, puesto que la identificación de *E. coli* se basó en la clasificación mediante el programa BD BBL™ Crystal MIND software para la obtención del biotipo. El biotipo bacteriano hace referencia a la morfología o apariencia de una bacteria en base a su fenotipo y genotipo, por lo que no tiene en cuenta la patogenicidad de la bacteria basada en sus antígenos (28). Por lo tanto, este sistema no

permite diferenciar si la presencia de diarrea del animal se debe a la presencia de una cepa patógena de *E. coli* o bien a una cepa comensal del gastrointestinal (29). La infección por *E. coli* suele afectar con mayor frecuencia a los animales menores de 10 días, sin embargo los resultados de este estudio indican que no existen diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia en función de la edad. Estos resultados coinciden con lo observado anteriormente por Muñoz et al. (1996), que estudiaron la prevalencia de cepas patógenas de *E. coli* en corderos y cabritos en el norte de España.

Otro de los agentes etiológicos del síndrome diarreico neonatal es *Salmonella* spp. Esta bacteria representa la segunda causa de intoxicación alimentaria en humanos a nivel mundial, con más de 100.000 casos al año en la Unión Europea (30). El principal reservorio de *Salmonella* spp. es el intestino de aves salvajes y diversas especies de mamífero. En pequeño rumiante, la prevalencia varía notablemente entre estudios. Diversos autores hablan de porcentajes de entre un 5-8% (10) pudiendo alcanzar hasta un 14,0% en algunas explotaciones (15). Se cree que las diferencias entre la prevalencia observada en la literatura podrían variar debido a numerosos factores incluyendo entre ellos la edad de los animales (10). En España, se han descrito prevalencias desde un 2,0% hasta un 7,0% obtenidas de muestras procedentes exclusivamente de cabritos. En el estudio realizado, la prevalencia de *Salmonella* spp. se aproxima bastante a la bibliografía reportada, suponiendo un 1% del total de muestras analizadas, pero no es significativo por especies.

Además de la especie, existen otros muchos factores que predisponen al desarrollo de las diarreas neonatales en corderos y cabritos. Entre los principales factores relacionados con una mayor predisposición a sufrir esta patología destaca el encalostramiento y el tipo de lactancia recibida de los corderos y cabritos. También se encuentran factores derivados de la anatomía y fisiología propia de los pequeños ruminantes, como el tipo de placentación, la breve capacidad de absorción de inmunoglobulinas (g) y la predisposición de primíparas con sistemas inmunes menos desarrollados (6). Por otro lado, la baja actividad proteolítica intestinal y la carencia de una microbiota definida en el tracto digestivo del animal neonato, también predisponen a sufrir este síndrome (6). Otra serie de factores a considerar incluyen el manejo sanitario de los animales, el estado higiénico de la paridera, el número de animales por granja o la edad de las crías (7). Sin embargo, a pesar de las repercusiones económicas

que tiene este síndrome, hasta el momento existen pocos estudios sobre la contribución de todos estos factores en el síndrome diarreico neonatal.

Por otro lado, en cuando a *C. perfringens*, diversos autores señalan una posible relación entre la especie y la aparición de diarrea. Un estudio a nivel nacional realizado en cabritos ha descrito una prevalencia de entre un 8-10% (5). En el estudio realizado, la prevalencia de *C. perfringens* ronda un 44,3%, con una prevalencia significativamente mayor en cabritos que en corderos. Estos resultados están en concordancia con los de otros estudios en los que también se aisló *C. perfringens* con mayor frecuencia en ganado caprino y en edades de entre 0 y 5 días (5). También se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia del patógeno según la edad de los animales. Las diarreas neonatales están ampliamente estudiadas en terneros. Sin embargo, sobre diarreas en pequeño rumiante los estudios más recientes constan de finales de los años noventa y principios de la década de los 2000, por lo que es probable que la diferencia numérica de la prevalencia de *C. perfringens* se deba en parte al escaso número de investigaciones acerca de estos agentes en pequeño rumiante.

Otro de los agentes más frecuentemente implicados en la etiología del síndrome diarreico neonatal es *C. parvum*. Según diversos estudios la prevalencia de *C. parvum* se sitúa en un 46,0% en terneros, 76,0% en cabritos y 29,0% en corderos (31). Sin embargo, los resultados de este estudio revelan una prevalencia mucho más baja del patógeno (8,8%). La baja prevalencia observada en este estudio podría explicarse por las dificultades en la toma de muestras de material fecal, ya que la cantidad obtenida fue bastante baja en todos los casos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Muñoz et al. (1996), que concluyeron que una baja concentración de ooquistes en las muestras puede traducirse en la subestimación de la prevalencia real. En cuanto a la asociación de la edad o la especie, con la aparición de diarrea causada por *Cryptosporidium parvum*, parece tener mayor relevancia en corderos frente a cabritos y en edades de entre 6 y 10 días (5). A pesar de que la bibliografía indica que *C. parvum* se localiza con mayor frecuencia en corderos en la primera semana de edad, en este estudio no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de edad ni en función de la especie (30).

La prevención de este síndrome es esencial para minimizar las repercusiones económica en el sector caprino y ovino, pero requiere el control y conocimiento de los

factores ambientales que predisponen el desarrollo de diarrea por *C. parvum* tanto en animales como en humanos (18). Los pequeños rumiantes suponen un reservorio para la mayoría de los agentes implicados (18). Diversos estudios señalan que los animales adultos asintomáticos son una fuente de infección para los neonatos y pueden a su vez suponer una fuente de contagio en humanos (30). En los últimos años se han reportado varios brotes relacionados con el contacto con pequeños rumiantes (31, 32, 33). Estos agentes resultan especialmente peligrosos en personas inmunodeprimidas, ancianos y niños (31). Concretamente, en 2015 se reportó en Noruega un caso donde 13 niños fueron hospitalizados a causa de una infección por *E. coli* O157 tras visitar una granja escuela, llegó incluso a producir la muerte de uno de ellos (31). En 2005 hospitalizaron otros dos niños en el Reino Unido a causa de una severa infección causada por el mismo agente tras visitar un parque zoológico (32). También se han registrado casos de *S. Typhimurium* y *C. parvum* en diversos países europeos (32). En 2001 el granjero de una explotación en Dinamarca acabó hospitalizado debido a fuertes diarreas causadas por *Salmonella* spp y por *C. parvum* enfermaron 27 niños y 4 adultos que visitaron una granja escuela en Austria a finales de los noventa (32).

Por lo tanto, el síndrome diarreico neonatal tiene un impacto importante a nivel sanitario y económico de las explotaciones, pero también supone un problema a nivel de salud pública. En este sentido, resulta imprescindible continuar con la investigación sobre la epidemiología de los diferentes agentes involucrados para conseguir una mejora en el tratamiento, control y prevención de esta patología. También, resultaría muy interesante la caracterización de las cepas aisladas para identificar su carácter patógeno, así como el estudio de las resistencias microbianas, especialmente *E. coli* y *Salmonella* spp.

## 8. CONCLUSIONES

La prevalencia de *E. coli* en las explotaciones de pequeño rumiante de la Comunidad Valenciana es de un 90,6%. La prevalencia de *Salmonella* spp. en las explotaciones de pequeño rumiante de la Comunidad Valenciana es de un 1,0%. La prevalencia de *Clostridium perfringens* en las explotaciones de pequeño rumiante de la Comunidad Valenciana es de un 44,3% y la prevalencia de *C. parvum* es del 8,8%.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. El sector caprino y ovino de carne en cifras. MAPAMA 2018.
2. SITRAN 2017.
3. Informe de consumo 2017. MAPAMA 2017.
4. Martella V, Decaro N, Bionavoglia C. Enteric viral infections in lambs or kids. *Vet Microbiol.* 2005; 181(1-2):154-60.
5. Muñoz M, Alvarez M, Lanza I, Cármenes P. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiol Infect.* 1996; 117(1):203-11.
6. Contreras A, Corrales JC, Sánchez A. Enfermedades infecciosas de los rumiantes. 1ªed. Murcia: DM; 1997.
7. Gianidis ND, Papadopoulos E, Lafi SQ, Papanikolopoulou V, Karanikola S, Diakou A, et al. Epidemiological Observations on Cryptosporidiosis in Diarrheic Goat Kids in Greece. *Vet Med Int.* 2015; 1-4.
8. Informe técnico. Dirección General de Desarrollo Rural de Aragón 2007.
9. Holmoy IH, Waage S, Granquist EG, L'Abée-Lund TM, Ersdal C, Hektoen L, et al. Early neonatal lamb mortality: postmortem findings. *Animal.* 2017; 11(2):295-305.
10. Yang R, Abraham S, Gradner GE, Ryan U, Jacobson C. Prevalence and pathogen load of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157/O145 serogroup in sheep faeces collected at sale yards and in abattoir effluent in Western Australia. *Aust Vet J.* 2017; 95(5):143-148.
11. Stipetic K, Chang YC, Peters K, Salem A, Doiphode SH, McDonough PL, et al. The risk of carriage of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in food animals in dynamic populations. *Vet Med Sci.* 2016; 2(4):246-254.
12. Tortora JG, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología. 9ªed. Zaragoza: Panamericana; 2007.
13. Monitorización de zoonosis. AECOSAN 2017.
14. Center of Food Security and Public Health. Iowa State University.
15. Hanlon KE, Miller MF, Guillen LM, Evecherry A, Dormendy E, Cemo B, et al. Presence of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 on the hide, and presence of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 and *Campylobacter* in feces from small-ruminant (goat and lamb) samples collected in the United States, Bahamas and Mexico. *Meat Sci.* 2018; 135:1-5.

16. Nazki S, Wani SA, Parveen R, Ahangar SA, Kashoo ZA, Hamid S, et al. Isolation, molecular characterization and prevalence of *Clostridium perfringens* in sheep and goats of Kashmir Himalayas, India. *Vet World*. 2017; 10(12):1501-1507.
17. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. 1ªed. Zaragoza: Acribia; 2005.
18. Romero-Salas D, Alvarado-Esquivel C, Cruz-Romero A, Aguilar-Domínguez M, Ibarra-Priego N, Merino-Charrez JO, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* in small ruminants from Veracruz, Mexico. *BMC Vet Res*. 2016; 12:14.
19. Sanz Pérez. *Cryptosporidium* y *Toxoplasma*. Dos importantes protozoos parásitos transmisibles por los alimentos y el agua. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1113/1130>
20. Odden A, Vatn S, Ruiz A, Robertson LJ, Enemark HL, Nes SK. et al. Excretion of *Eimeria* spp. oocysts in young lambs following iron supplementation. *Acta Vet Scand*. 2018; 60(1):49.
21. Sánchez C, Ramo A, Del Cacho Malo E, Quílez J. La coccidiosis en Ganado ovino. Departamento de patología animal. Facultad de veterinaria de la universidad de Zaragoza. Portal veterinaria. Disponible en: <https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/11022/la-coccidiosis-en-el-ganado-ovino.html>
22. Yang R, Jacobson C, Gardner G, Carmichael I, Campbell AJ, Ryan U. Longitudinal prevalence, oocyst shedding and molecular characterisation of *Eimeria* species in sheep across four states in Australia. *Exp. Parasitol*. 2014; 145:14-21.
23. Antoszek J, Balicka-Ramisz A. Occurrence of *Eimeria* protozoa in lambs in Western Pomerania, Poland. *Wiad Parazytol*. 2009; 55(1):35-8.
24. Niine T, Peetsalu K, Tummeleht L, Kuks A, Orro T. Acute phase response in organic lambs associated with colostrum serum amyloid A, weight gain, and *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Res Vet Sci*. 2018; 121:117-123.
25. Papp H, Malik YS, Farkas SL, Jakab F, Martella V, Bányai K. *Rotavirus* strains in neglected animal species including lambs, goats and camelids. *Virusdisease*. 2014; 25(2):215-22.
26. López-Pineda H, Aguilar-Ruvalcaba CD, Castro-Angulo A, Espinoza-Castro JM, Espinoza-Inzunza O, Mendivil-Carillo I. Identificación, Obtención, Análisis y Características de un cultivo puro de bacteria para su estudio. ITSON. Disponible en: [https://www.academia.edu/12547339/Bacterias Métodos para la identificación y aislamiento de la E. Coli](https://www.academia.edu/12547339/Bacterias_Métodos_para_la_identificación_y_aislamiento_de_la_E._Coli)

27. Norma UNE-EN ISO. 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
28. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Awetz, Melnick y Adelberg: Microbiología médica. 27ªed. México: McGrawHill Lange; 2004.
29. Oporto B, Ocejo M, Alkorta M, Marimón JM, Montes M, Hurtado A. Zoonotic approach to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: integrated analysis of virulence and antimicrobial resistance in ruminants and humans. *Epidemiol Infect.* 2019; 147-164.
30. Causapé AC, Quílez J, Sánchez-Acedo C, del Cacho E, López-Bernad F. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet Parasitol.* 2002; 104(4):287-98.
31. Moller-Stray J, Eriksen HM, Bruheim T, Kapperud G, Lindstedt BA, Skeie A, et al. Two outbreaks of diarrhoea in nurseries in Norway after farm visits, April to May 2009. *Euro Surveill.* 2012; 17(47).
32. Stirling J, Griffith M, Dooley JS, Goldsmith CE, Loughrey A, Lowery CJ, McClurg R, et al. Zoonoses associated with petting farms and open zoos. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008; 8(1):85-92.
33. Rowell S, King C, Jenkins C, Dallman TJ. An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O157 linked to a lamb-feeding event. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(12):2494–2500.

**10. ANEXOS**

**Anexo I:** Resumen de las explotaciones de pequeño rumiante donde se realizó la toma de muestras.

Explotación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Localización	Massanasa (Valencia)	Vilafamés (Castellón)	Vall d'Uixó (Castellón)	Catadau (Valencia)	Loriguilla (Valencia)	Aldaia (Valencia)	Requena (Valencia)	Monóvar (Alicante)	Aspe (Alicante)	Alfarp (Valencia)
Especie	Ovino/Caprino	Ovino	Ovino	Ovino	Ovino/Caprino	Ovino/Caprino	Caprino	Caprino	Ovino	Ovino/Caprino
Raza	Indeterm.	INRA 104	Lacaune	Lacaune	Indeterm.	Indeterm /MG	MG	MG	Segureña	RA/SC
Orientación	Cárnica	Cárnica	Lechera	Lechera	Cárnica	Cárnica/Lechera	Lechera	Lechera	Cárnica	Cárnica
Censo	Pequeño 120	Grande 3000	Grande 1800	Grande 3000	Medio 600	Pequeño 300	Grande 1500	Mediano 400	Grande 1200	Pequeña 300
Lactancia	Natural	Natural	Artificial	Artificial	Natural	Natural	Artificial	Natural	Natural	Natural