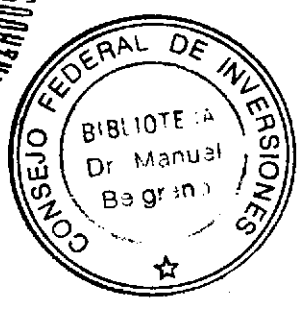
01H.12241
F 29
IV
42508



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE SERVICIOS AL SECTOR AGROPECUARIO

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
CAPITULO I - INTRODUCCION	3 - 40
BRUCELOSIS	3
VIBRIOSIS BOVINA	8
TRICHOMONIASIS	11
PARASITOS INTERNOS DE LOS RUMIANTES	15
DISTOMATOSIS	21
DIARREA VIRAL BOVINA	25
RINOTRAQUEITIS VIRAL BOVINA	32
CAPITULO II - DEL LABORATORIO	40 - 43
LOCAL DE LABORATORIO	40
MATERIAL DE LABORATORIO	41
ESTERILIZACION	42
CAPITULO III - DE LAS SOLUCIONES	43 - 65
PARA DIAGNOSTICO SEROLOGICO	44
PARA DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO	47
PARA DIAGNOSTICO DE PARASITOSIS	51
PARA DIAGNOSTICO DE TRICHOMONIASIS	54
PARA DIAGNOSTICO DE VIBRIOSIS	62
CAPITULO IV - DE LA TOMA DE MUESTRAS	66 - 78
PARA SEROLOGIA	66
PARA COPROPARASITOLOGIA	70
PARA ENFERMEDADES VENEREAS	72
CAPITULO V - DE LAS TECNICAS	78 - 126
BRUCELOSIS - SEROLOGIA	78
BRUCELOSIS - BACTERIOLOGIA	89
PARASITOLOGIA	97
CAMPILOBACTERIOSIS	109

CAPITULO I.

INTRODUCCION.

Se define una prueba tamiz como la prueba que identifica certeramente a los reaccionantes positivos de un agente etiológico determinado.

Una prueba tamiz debe ser:

- Sensible
- Especifica
- Rápida
- Fácil
- Económica

La sensibilidad y la especificidad pueden interpretarse desde dos puntos de vista:

1. Inmunológico: la sensibilidad de una prueba está dada por su capacidad de detectar pequeñas cantidades de antígeno (Ag.) o anticuerpos (Ac).
2. Epidemiológico: que considera a la sensibilidad como la habilidad de una prueba para detectar correctamente un animal con una enfermedad específica y a la especificidad como la habilidad para detectar correctamente animales sanos y/o aquellos que no poseen una enfermedad específica.

Una prueba sensible y específica en el sentido inmunológico no se comporta necesariamente igual en el sentido epidemiológico.

BRUCELOSIS

Definición: Es una enfermedad infecciosa, contagiosa; de curso crónico que afecta a

todas las especies domésticas y especialmente a animales sexualmente maduros, el hombre es un huésped accidental. Clínicamente se caracteriza por el abortos y anatomopatológicamente provoca lesiones inflamatorio- necróticas en diferentes localizaciones. Es una enfermedad distribuida mundialmente y producida por las especies del género *Brucella*:

- *B abortus*: afecta principalmente bovinos, produciendo aborto epizóotico o enfermedad de Bang. En el equino produce el mal de la cruz y mal de la nuca, que es la inflamación de las bolsas sinoviales de la cruz y de la nuca. En el hombre produce cuadros febriles y articulares.
- *B melitensis*: produce abortos en cabras y en el hombre provoca la fiebre ondulante o fiebre de malta.
- *B suis*: infecta a porcinos, al hombre y liebres.
- *B ovis*: provoca la epididimitis infecciosa del carnero.
- *B canis*: infecta caninos.
- *B neotomae*: infecta las ratas.

Epizootiología: La brucelosis es una antropozoonosis, que afecta a todas las especies domésticas, al hombre y a numerosas especies silvestres.

Es una enfermedad de distribución mundial y fue erradicada en los países escandinavos, Dinamarca, Países Bajos, Bélgica, Suiza, Alemania, Austria, Hungría, Checoslovaquia, Rumania y Bulgaria. Los grandes productores de carne como Francia, Gran Bretaña, Australia, Nueva Zelandia, Canadá y EEUU están libres o a punto de estarlo.

En nuestro país está ampliamente difundida en toda su extensión especialmente al

norte de Río Colorado y con mayor incidencia en la Pampa Húmeda.

Las distintas especies de *Brucella* se han adaptado a hospedadores específicos, así por ej.: la brucelosis bovina es causada por *B. abortus*, la porcina por *B. suis*, la caprina por *B. melitensis*. En estos casos tenemos como principal característica la diseminación masiva de la infección a todo el rodeo, pero también es posible la migración hacia otra especie animal que no es su huésped específico, con la característica que no ocurre difusión masiva de la enfermedad en esa población.

La **morbilidad** es variable, este índice oscila entre 10 a 50%. La enfermedad se mantiene endémica y prácticamente **no hay mortalidad** ni letalidad, a no ser que se computen los abortos o terneros nacidos enfermos, ya que el adulto no muere.

La única ocasión en que la Brucelosis se comporta como epidemia es cuando ingresa a un rodeo y causa un brote de abortos entre las hembras preñadas.

Patogenia:

El período de incubación en la infección natural es muy difícil de determinar por que no es posible saber el momento de la infección. Por experimentación se ha demostrado que el período de incubación es sumamente variable e inversamente proporcional al desarrollo del feto. Cuanto más adelantada está la preñez, más corto será el período de incubación. El período de incubación serológica "desde la infección hasta la aparición de anticuerpos" dura de varias semanas a varios meses. Factores tales como la virulencia y la dosis de la bacteria, la vía de infección y la susceptibilidad del animal posibilitan cursos diferentes que pueden ir desde la brucelosis clínicamente manifiesta, la infección latente o la ausencia de la infección.

Las brucelas que penetran en el organismo animal se multiplican primero en los

ganglios regionales y luego son conducidas por la linfa y sangre a diferentes órganos, donde produce procesos inflamatorios.

En general la localización es en S.R.E. (ganglios linfáticos, bazo e hígado), útero, ubre, médula ósea, articulaciones, vainas tendinosas y bolsas serosas.

En la placenta de la vaca se ha podido demostrar la existencia de una gran cantidad de eritritol, un hidrato de carbono que estimula la multiplicación de las brucelas, lo que explicaría la gran susceptibilidad de los tejidos fetales del bovino.

Después que una vaca infectada sufre un aborto o pare normalmente, el agente no permanece mucho tiempo en el útero. La infección pasa a un estado crónico y las brucelas se acantonan en los ganglios y glándula mamaria de la vaca. En la ubre las brucelas, pueden permanecer durante años.

En las vacas el principal signo es el aborto, a partir del 5° mes de gestación. En las próximas preñeces la gestación llega a término. Pueden producirse partos prematuros o nacimientos a término de terneros muertos o débiles. Es característica la retención de placenta y la infección uterina.

En los caprinos el aborto se produce al final de la gestación, tormenta de abortos cuando recién ingresa la enfermedad, mastitis. En los brotes agudos se producen diarreas con pérdidas de peso y fiebre.

La *B. melitensis* en los ovinos produce lesiones articulares y signos nerviosos.

La *B. ovis* provoca como principal signo la epididimitis del carnero.

B. suis provoca disminución del tamaño de las camadas, nacimientos prematuros y aborto.

Control de la enfermedad en bovinos.

1- **Vacunación:** La vacunación de las terneras es obligatoria de acuerdo a lo dispuesto en las Resoluciones 698/80 y 1269/ 93.

2- **Efecto de la vacunación:** La aplicación de la vacuna no trae aparejada la erradicación de la enfermedad, sino que tendrá el efecto de control al sustituir dentro de un rodeo animales enfermos o susceptibles por vientres resistentes a la infección.

De acuerdo a diferentes trabajos podemos asumir que tiene una capacidad de protección del 75%, en un rodeo de mediana infección, con una cobertura más alta sobre la tasa de abortos, lo que provocará una disminución del riesgo a la infección, teniendo en cuenta la descarga al medio de bacterias en ese momento. Con solo vacunar no se sanea totalmente un rodeo sino se le suma a esta práctica, el diagnóstico y descarte de los positivos. Haciendo esto último sin una buena cobertura vacunal en el rodeo tampoco se logra la erradicación, con el agravante del costo económico que esto provocaría.

3- **Vacuna:** La única vacuna aprobada en el país es la *Brucella abortus* Cepa 19, liofilizada. Es elaborada por laboratorios habilitados y controladas el 100% de las series por el SENASA, que la identifica con estampilla oficial, con un número que individualiza frasco por frasco, con su serie y vencimiento.

4- **Edad y sexo de los animales a vacunar :** La legislación establece que se vacunarán solamente hembras de 3 a 10 meses de edad. Si bien a la edad mencionada los títulos pos- vacunales no interfieren el diagnóstico, es aconsejable realizarlo a una edad más temprana, en la cual los títulos residuales bajarán más rápido, pero con la concentración bacteriana actualmente utilizada en nuestro país, que es entre 15 y 30 x 10^9 bacterias / dosis (dosis de 2 m) este problema ha

desaparecido, permitiendo su uso hasta los 10 meses de edad, facilitando el acto vacunal desde el punto de vista práctico.

No se deben vacunar los machos de ninguna edad porque se ha comprobado que en algunos animales la cepa vacunal puede localizarse en los órganos genitales reduciendo o anulando la eficiencia sexual y presenta persistencia de los títulos.

VIBRIOSIS BOVINA

Es una enfermedad venérea del ganado bovino, que se caracteriza por infertilidad temporaria en la hembra y ocasionalmente abortos. Las manifestaciones clásicas son repetición en el servicio, retardo en la concepción y eventualmente desarrollo de una inmunidad convaleciente. El signo común en el rodeo infectado es la prolongación en el período de servicio con reducción de los porcentajes de preñez en vaquillonas o vacas que han tenido un primer contacto con la enfermedad.

Etiología.

El agente causal de la vibriosis bovina es el *Campylobacter fetus* (*C. fetus*).

Los *C. fetus subesp. venerealis* e *intermedius* se transmiten por contacto sexual (transmisión venérea). Sus hábitos naturales son el tracto reproductor bovino. En el macho se localizan en la cavidad prepucial y en particular en la mucosa del glande peneano, prepucio y porción distal de la uretra. En la hembra se localizan en la vagina, cérvix, útero y oviductos.

El *C. fetus subesp. intestinalis* produce abortos esporádicos en el bovino y

tormentas de abortos en el ovino. Puede sobrevivir por ciertos períodos en el intestino, pero no en el tracto genital de las vacas, aunque sí en el prepucio del macho.

El *C. sporotum subesp. bubulus* es un vibrión no patógeno.

Patogenia en el macho.

El toro infectado es simplemente un portador asintomático de la enfermedad. La calidad y cantidad del semen no se ven afectadas excepto que al estar contaminado, disminuye su eficacia. Además no se producen alteraciones histológicas durante la infección. Ello se debe a que el *C. fetus* es sólo una especie de la población microbiana que vive en ese ambiente compuesto por desechos celulares, criptas y arrugas formadas en la membrana del pene y prepucio durante el descanso sexual. No existen respuestas inflamatorias o inmunológicas.

La susceptibilidad en los toros, difiere dependiendo de la edad de los mismos. La mayor susceptibilidad se presenta en los toros adultos, debido al mayor desarrollo de las criptas prepuciales.

Patogenia en la hembra.

En condiciones naturales la vaca se infecta en el momento del servicio, cuando los microrganismos son depositados en el tracto genital por medio de un toro infectado o semen no tratado.

Cualquier hembra madura sexualmente, no expuesta previamente a la infección es altamente proclive a contraer la enfermedad. No parecen existir diferencias de susceptibilidad en cuanto a edad (vacas o vaquillonas). Entre el 10 a 15 % de

las hembras presentan resistencia natural.

Infertilidad.

La manifestación más importante de la enfermedad es la infertilidad. Si la hembra ha concebido y el embrión muere antes de la implantación (día 14) el próximo celo aparecerá en un período normal. Si el embrión muere después de la misma y antes de la placentación (día 33), la infección se manifiesta por ciclos estrales largos de 27 a 52 días con un promedio de 32.

La presencia de *C. fetus* usualmente no tiene influencia en la estabilización del blastocisto pero causa la muerte entre los 15 a 21 días después de la concepción. Durante el período de preimplantación el embrión tiene esenciales requerimientos de oxígeno y lo afecta severamente una baja tensión de éste. El *C. fetus* puede bajar rápidamente la tensión de oxígeno y así retardar el período de implantación en el endometrio. La mucinasa provoca la despolimerización del mucus e incrementa la permeabilidad del tracto genital, permitiendo la entrada del germen y su llegada al epitelio glandular del útero.

Se sugiere que la infertilidad podría deberse a la endometritis y a un efecto directo del *C. fetus* en la concepción. La infección produce una leve endometritis y cambios inflamatorios menores en el oviducto. La principal lesión histopatológica es una reacción con células linfocíticas y plasmáticas en el endometrio. La mucosa uterina presenta edema y distensión de los canales linfáticos. Se encuentran áreas focales de hiperemia en el endometrio. El cérvix presenta un exudado mucopurulento similar al del útero.

Aborto.

El aborto fue considerado en un principio como el síntoma principal de la enfermedad. Entre el 5 y 10 % abortan después de los 5 meses de gestación y en general abortan entre los meses 4 y 7 de gestación. Es probable que la mayoría de los abortos se produzcan antes de los 4 meses, pero pasan desapercibidos o se toman como infertilidad o falta de concepción al momento del tacto.

En los abortos precoces la placenta es eliminada junto con el feto, pero en los tardíos puede existir retención placentaria. El feto abortado muestra cierto grado de autólisis con edema subcutáneo, líquido seroso y sanguinolento en cavidades corporales con algunos depósitos de fibrina en las serosas corporales. El contenido del estómago normal a base de moco incoloro, denso y viscoso se vuelve espeso, amarillento, floculento y turbio.

TRICHOMONIASIS BOVINA.

Es una enfermedad venérea causada por el parásito unicelular denominado *Trichomona foetus* que provoca mortalidad embrionaria, infertilidad temporal en la hembra bovina y ocasionalmente aborto.

Agente etiológico.

Es parásito de los bovinos, aunque también puede infectar a cerdos, caballos y ciervos pero sólo se observan efectos patógenos en los bovinos, produciendo la enfermedad venérea conocida como tricomoniasis bovina.

Esta especie se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo y tuvo una gran importancia económica por las pérdidas que produce, pero actualmente con el uso de la inseminación artificial (I.A.) con semen controlado y el control de los toros antes del

período reproductivo ha disminuído su incidencia.

Transmisión.

En condiciones naturales la enfermedad se transmite durante el coito, también puede transmitirse por I.A. y durante el examen ginecológico de las vacas, hospedadores potenciales.

Patogenia y epizootiología.

Macho

La infección tiene localización exclusiva en pene y prepucio, sin manifestaciones clínicas, actuando los toros como portadores de la infección de por vida.

No existirían diferencias de susceptibilidad entre razas tanto en *Bos taurus* como *Bos indicus*.

Si bien no se conocen los factores que condicionan la susceptibilidad en el macho, la incidencia varía entre 7,5 y 22 % aunque en algunos casos, puede ser mayor. La recuperación espontánea de un macho se la considera como nula, en la cadena epizootiológica. El toro afectado no ve comprometida su libido ni su calidad seminal.

La edad juega un papel importante en la susceptibilidad a la enfermedad, siendo los toros más viejos los más susceptibles; esto podría deberse a que tienen mayor oportunidad de adquirir la infección, o bien, por el mayor desarrollo de criptas y pliegues prepuciales que crearían condiciones ideales para que el parásito se instale.

No se encontraron lesiones macro ni microscópicas atribuibles a este agente. La zona con mayor población de parásitos en la cavidad prepucial y pene de los toros infectados resulta ser el área posterior al glande y prepucio adyacente. Existe una serie de factores que pueden influir en la población de T. foetus y ser responsables de

dar resultados negativos en toros que en realidad están infectados, tales como cambio del pH en la cavidad prepucial, contaminación bacteriana, vecindad del coito, etc. Las fluctuaciones en la concentración de parásitos en la cavidad prepucial se explican por los cambios ambientales que se producen en la cavidad prepucial. Estas fluctuaciones se observan cada 5 a 10 días, esto es muy importante para decidir el momento en que se deben realizar los muestreos. Asimismo, existe una gran población de flagelados en muestras de toros que han tenido descanso sexual previo. La inseminación artificial puede ser una herramienta útil para el control de la enfermedad pero si no se la maneja adecuadamente puede ser peligrosa, ya que se ha demostrado que el T. foetus tiene capacidad de sobrevida en el semen infectado congelado, así como capacidad de transmitirse por medio del uso de utensilios contaminados como vaginas artificiales, lubricantes, etc.

Hembra.

Las vacas y vaquillonas que no han tenido contacto previo con el agente son altamente susceptibles, aunque al mismo tiempo autocontrolables ya que en estas se produce el fenómeno de autoinmunidad, de gran importancia en el manejo de la enfermedad. El contagio se efectúa por medio de un toro infectado durante el servicio natural o por utilización de semen infectado durante la inseminación artificial.

No existe el contagio por contacto directo entre vacas.

El contagio por vía pasiva, se produce al ser servida una hembra infectada por un toro sano y transportar la infección a una hembra susceptible en un tiempo no menor a 20 minutos, hecho que durante el servicio natural no ocurre. En cambio, los toros pueden realizar servicios en esa frecuencia de tiempo durante la ejecución de la PRUEBA DE

CAPACIDAD DE SERVICIO, por lo tanto es imprescindible que dicha prueba se realice en rodeos sanos y preferiblemente con vaquillonas.

Existe un 5 a un 20 % de hembras que son resistentes a la infección.

La infección local producida en la vagina, muchas veces pasa desapercibida, y su duración es variable, pudiendo persistir en esa localización por 1 a 5 meses, tiempo en el cual se desarrolla inmunidad. En dicho período no siempre se encuentran flagelados en la vagina, excepto al final del diestro que migran del útero a la vagina. Generalmente la inmunidad aparece en vagina entre 23 y 30 días posteriores al primer celo. Algunos autores consideran necesario el transcurso de 4 ciclos estrales para que se produzca inmunidad (Bartlett).

Si se produce la preñez de la hembra que no ha desarrollado inmunidad, generalmente ocurre muerte embrionaria y alteración del ciclo estral; sin embargo la preñez puede continuar y producirse un aborto precoz antes del cuarto mes de gestación. Si el feto no es expulsado se produce piómetra (infección del útero) postservicio y hay que establecer la diferencia entre ésta y la piómetra que se produce en el postparto por retención placentaria. En el contenido uterino hay una alta concentración de parásitos. Puede existir un bajo porcentaje de hembras que a pesar de continuar con la gestación, sean portadoras, aunque suelen liberarse de la infección en el primer o segundo celo postparto.

Los cambios macroscópicos que se presentan en el mucus no deben ser tenidos en cuenta como elemento diferencial con hembras no infectadas, pues muchas veces no son distinguibles.

Las principales lesiones encontradas en el tracto genital femenino son perimetritis,

endometritis, vaginitis, hidrosalpinx, piómetra y salpingitis. Las lesiones más severas aparecen entre los 60 y 90 días postinfección.

PARASITOS INTERNOS DE LOS RUMIANTES.

En los sistemas de producción de ganado vacuno, la parasitosis gastrointestinal es una de las enfermedades que mayores perjuicios económicos producen.

La inclusión de las pasturas en la cadena forrajera ha obligado a aumentar la carga animal para maximizar la producción de carne por unidad de pastoreo. Los parásitos internos se han convertido en la causa más importante de pérdidas de producción medidas en términos de ganancia de peso, desarrollo esquelético-muscular y genital en hembras de reposición y en producción de leche.

Los vermes más comunes de los rumiantes pertenecen a los siguientes géneros: *HAEMONCHUS*, *OSTERTAGIA*, *TRICHOSTRONGYLUS*, *COOPERIA*, *NEMATODIRUS*, *BUNOSTOMUN*, *CHABERTIA*, *OESOPHAGOSTOMUN*, *STRONGYLOIDES* y *TRICHURIS*.

Ciclo de vida.

El ciclo biológico de los parásitos gastrointestinales es de tipo directo y por lo tanto no involucra huéspedes intermediarios. Consta de una fase que desarrolla sobre el huésped (relación parásito-animal) y otra de vida libre (relación parásito-medio ambiente).

Los animales al ingerir el forraje con larvas 3 infectantes(L3) adquieren la infección parasitaria. Estas, luego de desprenderse de su cutícula externa, penetran en la mucosa del abomaso o del intestino, dependiendo de su localización definitiva. Allí mudan a larva 4 y larva 5, aumentando su tamaño de 8 a 10 veces; posteriormente

abandonan la mucosa y se fijan por su extremidad anterior en la superficie de esta. Una vez alcanzada la madurez sexual, se produce la cópula entre machos y hembras y éstas inician la oviposición. Cada una de ellas ovipondrá varios miles de huevos a lo largo de sus 4 a 12 semanas de vida.

El período de prepatencia se define como el tiempo transcurrido desde la ingestión de las L3 infestantes hasta el inicio de la oviposición de las hembras. Este es de aproximadamente 3 semanas para la mayoría de los géneros (4 semanas para el *Dictyocaulus* y 6 para el *Oesophagostomun*), excepto cuando se produce la **inhibición del desarrollo o hipobiosis** (especial, pero no exclusivo del género *Ostertagia*)en el que el período de prepatencia se extiende de 4 a 5 meses.

El ciclo externo o de vida libre, comienza cuando los huevos que fueron puestos por los parásitos hembras, caen al suelo con la materia fecal. Bajo condiciones apropiadas de aireación, humedad y temperatura (15 a 20 grados óptimos) evolucionan a larva 1(L1), que se encuentra recubierta por una cutícula.

Posteriormente mudan a L2, cambiando la cutícula que las recubren. Estos dos estadíos larvales se alimentan de hongos y bacterias presentes en la deposición fecal y almacenan energía en sus células intestinales bajo la forma de gránulos de glucógeno. Tienen muy escasa movilidad y son los estadíos más vulnerables a las condiciones ambientales desfavorables. Si la evolución continúa, mudan a L3 desarrollando una nueva envoltura por fuera y conservando la anterior. Esto le da mayor resistencia al medio ambiente aunque le impide alimentarse, por lo que su vida dependerá de la energía acumulada en los estadíos anteriores. Además poseen una gran movilidad.

El ciclo se completa cuando bajo adecuadas condiciones de humedad (época de lluvias) las L3 infestantes abandonan la materia fecal y alcanzan los pastos con los que serán ingeridas por los huéspedes definitivos. Existen algunas excepciones como el Nematodirus que alcanza el estadío de larva infestante en el interior del huevo y mientras unos eclosionan espontáneamente, otros necesitan de ciertos estímulos.

Alteraciones fisiopatológicas.

Los cambios producidos en el tracto digestivo por los parásitos y las consecuencias en términos de producción han sido investigados en los últimos años.

Consecuencias en el animal.

- Disminución del apetito: la reducción de la ingesta voluntaria es el efecto más importante de la parasitosis gastrointestinal. Las causas de este efecto varían dependiendo del dolor local, reducción del tránsito digestivo y niveles aumentados de hormonas como gastrina y colecistoquinina. En el manejo tradicional del rodeo esto se traduce en una subutilzación del recurso forrajero.
- Alteración de la digestibilidad del alimento: las modificaciones producidas a nivel estructural y funcional del tubo gastrointestinal, afectan la digestibilidad de los alimentos y el metabolismo del calcio, fósforo, agua y balance electrolítico, que se traduce como disminución del crecimiento.
- Redistribución de las proteínas: la excesiva pérdida de las proteínas plasmáticas y la falta de incorporación de proteína de la dieta provoca la movilización de reservas protéicas acumuladas en el tejido muscular, hígado y piel. La redistribución de aminoácidos está asociada con la reducción en el área, peso y calidad del tejido muscular.

Efectos de la enfermedad en los sistemas de producción.

Los sistemas de producción de carne comprenden categorías de animales bien definidas, que son afectadas por los parásitos de distinta manera. Los efectos de la enfermedad dependen de la intensidad de infestación de la pastura, del tiempo de exposición y de la categoría afectada.

- *Sistema de cría:* aquí se encuadran dos categorías de animales: la vaca y el ternero. Las pasturas generalmente presentan un bajo nivel de infectividad como consecuencia de la baja carga animal y principalmente por la poca contaminación que producen las vacas a las pasturas. Los animales adultos desarrollan una sólida inmunidad, minimizando proporcionalmente la contaminación por huevos que pueden provocar los terneros.

  Bajo estas circunstancias la ganancia de peso de los terneros nacidos a principio de la primavera, en general no es afectada por los parásitos internos hasta mediados del verano. Esto se debe a los bajos niveles de infectividad de las pasturas y al efecto del amamantamiento diario. Sin embargo, cuando el destete se demora hasta mediados de otoño (común en campos de cría) se han observado diferencias de 10 a 15 kg por animal debido al incremento en la infestividad de la pastura (autoinfección), y de la independencia materna en la alimentación. Además no se debe descartar la desinhibición de larvas de *Ostertagia ostertagi*, que se encontraban en hipobiosis durante la primavera. La vaca de cría puede almacenar un número importante de parásitos en su tracto digestivo, aunque el efecto sobre la producción no exista. Esto se debe a la sólida

inmunidad que desarrollan los adultos. Las vacas se deben desparasitar solamente bajo condiciones de riesgo. Los toros aparecen como una categoría con importante susceptibilidad a las parasitosis, a juzgar por los niveles de huevos en la materia fecal registrados en muestreos periódicos de animales expuestos a la enfermedad.

- *Sistema de recría e invernada*: la enfermedad parasitaria produce efectos desbastadores en los animales, del destete hasta los 18-20 meses de edad. Se pueden diferenciar varios períodos de la enfermedad con diferentes impactos sobre la producción.

- Pastoreo de otoño: la infectividad de las pasturas hacia fines del verano y parte del otoño es usualmente baja, debido a la mortandad de larvas provocadas por el calor y la sequía. Por o tanto la evolución del peso de los animales es poco afectada.

  Sin embargo, cuando un número importante de larvas ha logrado sobrevivir el verano (en las bostas), se pueden registrar pérdidas de peso con la llegada de las lluvias de otoño y la infección se traslada a la pastura.

- Pastoreo en el invierno: Durante el invierno se producen las mayores pérdidas en producción. Esto se debe a los altos niveles de infección en las pasturas acompañadas por la pobre disponibilidad y calidad del forraje. Las bajas temperaturas y la alta humedad ambiental favorecen el desarrollo de otras enfermedades parasitarias, por ejemplo: ectoparásitos, lombriz de pulmón, etc. que potencian el problema. Bajo estas condiciones, los animales pueden desarrollar clínicamente la enfermedad, con pérdidas de peso que pueden alcanzar los 40 a 60 kg/ animal. Sin embargo, en la mayoría de los establecimientos la parasitosis

gastrointestinal cursa en forma subclínica, habiéndose detectado mermas de 20 a 40 kg/ animal hacia fines del invierno. Durante el invierno la evolución de la enfermedad es muy rápida y las acciones de control son poco efectivas.

- Pastoreo en la primavera: El nivel de infestividad aparente de las pasturas durante la primavera es bajo. Debido al rápido crecimiento de las pasturas que diluyen el número de larvas en el volumen de pasto consumido por los animales. Las ganancias de peso son proporcionales al nivel nutricional ofrecido y se pueden puntualizar dos aspectos importantes: el primero es que no hay compensación del peso perdido o dejado de ganar durante el invierno, aún desparasitando frecuentemente a los animales parasitados, el segundo aspecto, es que un alto porcentaje de larvas de *Ostertagia ostertagi* inhiben su desarrollo al llegar al estadío de L4 en la mucosa del abomaso, constituyendo la ostertagiasis tipo2.
- Pastoreo en el verano: los niveles de infectividad de las pasturas son usualmente bajos. La edad (18 a 20 meses) y el estado de los animales no crean problemas de producción atribuibles a parasitosis gastrointestinales. Sin embargo, se pueden producir pérdidas de peso como consecuencia de la desinhibición de las larvas ingeridas en la primavera. Cuando se produce una desinhibición masiva aparece la ostertagiasis tipo 2 clínica, con dierrea intensa, rápida pérdida de estado y muerte de animales del rodeo afectado.

➢ *Vaquillonas de primera parición*: Esta categoría puede ser seriamente afectada, principalmente si se realiza servicio a los 15 meses. Los animales pueden llegar al parto con una alta carga parasitaria contenidos por una buena inmunidad. Durante el parto y la lactancia se producen movimientos hormonales (corticoides) que

quiebran los sistemas de inmunidad, permitiendo que los parásitos continúen su ciclo de vida o aumenten su actividad patógena. En algunos casos se ha podido observar la presentación de síntomas clínicos. En establecimientos con antecedentes de enfermedad parasitaria debe considerarse el tratamiento de las vaquillonas previo al parto.

- *Efectos de la parasitosis gastrointestinal sobre la composición de la res y la producción de leche:* las reses de vacunos que sufrieron parasitosis subclínica presentan al tejido muscular como el tejido más afectado. Además los músculos del corte pistola de exportación son los más perjudicados. En vacas lecheras hay una diferencia de 5% de producción entre las tratadas de las no tratadas.

DISTOMATOSIS.

La distomatosis o fasciolosis es una enfermedad causada por un trematode denominado *Fasciola hepática*, afecta a animales y al hombre. El parásito en estado adulto mide 3 cm de longitud, se aloja en los canalículos biliares de los hospedadores y es de ciclo indirecto. El hospedador intermediario es el caracol *Lymnaea viatrix*, vive en zonas anegadizas, arroyos, acequias o colectas acuosas, bajo las siguientes condiciones: baja salinidad, pH entre 6 y 7,5, agua de turbidez escasa, poca profundidad y corriente lenta. En nuestro país se localiza en la mayoría de las provincias. La temperatura para su desarrollo varía entre los10 y 27°C. La longitud varía de 5 mm a 12 mm. La conchilla es de color castaño y traslúcida. Son hermafroditas, de alto potencial reproductivo. Se alimentan de detritus vegetales y de

algas unicelulares.

Ciclo de vida: los trematodes adultos se encuentran en los canalículos biliares, desde allí se eliminan los huevos que pasan por la vesícula biliar, intestino y llegan al exterior con la materia fecal. Pueden caer al medio acuoso o en el suelo.

Los huevos son de color amarillo, de 120 a 150 u, ovales y con opérculo. En el interior se forma una célula huevo y con la temperatura adecuada se forma el miracidio, esta es la forma que penetra en el caracol, dentro de éste se forman los estadíos de esporocisto, redia y cercaria; esta última forma sale del caracol y se enquista en los pastos formándose las metacercarias.

El tiempo que transcurre la *Fasciola* dentro del caracol es de 28 días.

El hospedador definitivo ingiere las metacercarias que están enquistadas en el pasto. Cualquier mamífero puede ser hospedador definitivo, los más comunes son los bovinos y los ovinos.

Una vez que la metacercaria se encuentra en el intestino, se libera del quiste, atraviesa el intestino, entra en la cavidad peritoneal y migra hacia el hígado, penetrando en el parénquima hepático. Durante su recorrido por el hígado forma trayectos necróticos y lo va destruyendo. En el hígado permanece aproximadamente 8 semanas, luego se localiza en los canalículos biliares donde alcanza la madurez sexual. Dentro de las 2 semanas próximas comienza la oviposición.

La enfermedad: La gravedad de la distomatosis varía según la cantidad de metacercarias que se ingieren, la edad del hospedador, la especie y el estado general del animal afectado. Si los ovinos ingieren 200 metacercarias, se cursa con sintomatología atenuada, pero si consumen 2000, la muerte se produce en el lapso de

4 a 8 semanas. Los bovinos son menos susceptibles, sólo se produce la muerte en terneros de 6 a 8 meses.

El estado corporal del animal es muy importante, hay que tener en cuenta que las asociaciones con *Haemonchus sp.* u *Ostertagia sp.* pueden llevarlos rápidamente a la muerte. Además de las parasitosis asociadas, hay enfermedades que aparecen como consecuencia de esta, como ser la clostridiosis producida por *Clostridium haemolyticum*, ya que el parásito crea las condiciones de anaerobiosis necesarias para la invasión bacteriana. Las lesiones que se presentan son hepatitis aguda traumática, en los animales que mueren repentinamente se presentan colectas sanguinolentas, el hígado está agrandado y friable. Hay acúmulo de fibrina y peritonitis fibrinosa. En el hígado se ven túneles provocados por las fasciolas durante su recorrido migratorio.

Si el número no es muy elevado la hepatitis no será tan marcada como en el curso agudo, pero sí se visualizan los recorridos migratorios fibrinosos. En el caso crónico se observará al hígado fibrótico y duro (cirrosis).

La distomatosis en el hombre: la mayor frecuencia de los casos en el hombre se asocia a la ingestión de berros contaminados con metacercarias. La presencia de Fasciola en los canalículos biliares del hombre provocan, malestar, fiebre intermitente, pérdida de peso, dolor bajo el margen costal derecho y frecuentemente prurito con eosinofilia. Se pueden observar urticaria, ictericia leve y anemia.

Control mediante tratamientos antihelmínticos.

Los tratamientos se pueden agrupar en tres categorías:

1. Tratamientos prefijados:

- Tratamiento táctico: se administran para aliviar los efectos en producción que provoca una alta infectividad de la pastura. Generalmente se administran durante el invierno cuando el mayor número de larvas se encuentra en las pasturas. Los animales estarán razonablemente protegidos, aunque la contaminación e infectividad de la pastura se mantienen en proporciones importantes.
- Tratamientos estratégicos: previenen una excesiva contaminación de las pasturas con huevos de nematodes. Se administran durante las primeras 12 a 15 semanas de pastoreo a intervalos que cubren el período prepatente de la enfermedad para limitar la oviposición. El nivel de infectividad de la pastura durante el invierno y primavera quedará lo suficientemente bajo como para no afectar las ganancias de peso.
- Tratamientos de verano: están orientados a remover las larvas de *Ostertagia ostertagi* acumuladas durante el pastoreo de primavera.
- Tratamientos mensuales: puede utilizarse limitadamente en aquellos establecimientos donde la infectividad de las pasturas es lo suficientemente alta como para provocar severos casos clínicos de la enfermedad. No debe tenerse como método de control, ya que es económicamente inviable y se corre el riesgo de originar la resistencia a los antiparasitarios.

2. Tratamientos por diferencia de engorde: la utilización de la balanza como detectora de parasitosis subclínica, ha demostrado una gran sensibilidad y precocidad en el diagnóstico. Se forman dos grupos, de 20 animales como mínimo, uno de los grupos recibe el tratamiento mensual y se lo considera como libre de parásitos. El otro grupo recibirá el tratamiento cuando las ganancias de

peso diarias sean menores a 50 gramos o más con relación a las del grupo testigo.

3. Tratamientos por parásitos parasitológicos y productivos: el objetivo principal es definir el riesgo potencial a que se ven sometidos todos los rodeos. Resulta necesario realizar una prolija anamnesis cuyos aspectos generales se detallan en el siguiente cuadro:

Referidos a :	**Factores:**
LA EPIDEMIOLOGÍA	• Nivel de infectividad larvaria actual y futura de los potreros ocupados. • Tratamientos realizados y drogas empleadas. • Epoca del año. • Condiciones climáticas. • Presión de pastoreo.
EL MANEJO	• Altura de corte en el pastoreo. • Posibilidades de cambio de potrero en el futuro y calificación del mismo. • Manejo alternado con diferentes especies animales.
LOS ANIMALES	• Edad y raza. • Niveles de infección y prevalencia de géneros parasitarios. • Estado nutricional. • Empleo de suplementaciones. • Presencia de otras enfermedades.

DIARREA VIRAL BOVINA.

ETIOLOGÍA.

El virus de la diarrea vírica bovina pertenece a la familia *Togaviridae*, género *Pestivirus*. Guarda relación estrecha con el virus que produce la Peste Porcino Clásica (PPC) y la enfermedad de Border en los ovinos. Existen cepas citopáticas y no citopáticas dependiendo de la actividad del virus sobre los cultivos tisulares,

aunque no necesariamente la patogenicidad del virus en el animal.

Este agente es de distribución mundial, causa la enfermedad de las mucosas en bovinos, también denominada diarrea viral bovina (BVD-MD). El virus causa viremia persistente y se aísla fácilmente del bazo, sangre, vasos linfáticos, vías respiratorias e intestino, así como de cultivos de leucocitos en casos subclínicos. EPIDEMIOLOGIA.

Las enfermedades originadas por el virus de la BVD se han registrado en la mayoría de los países donde se crían bovinos. La prevalencia media de animales con viremia persistente en los rodeos es de aproximadamente 1 a 2%.

La incidencia clínica de la enfermedad de las mucosas suele ser inferior al 5% en animales de hasta 2 años de edad. Ocasionalmente se han observado epidemias en las cuales hasta un 25% o incluso más, de los animales del grupo de edad más frecuentemente afectado, desarrollan la enfermedad de las mucosas.

Los bovinos son la única especie que desarrolla la enfermedad de las mucosas (MD). Estudios serológicos sobre algunas poblaciones de ovinos y caprinos demuestran que el 11% de los ovinos y el 16% de los caprinos tenían anticuerpos neutralizantes frente al virus. El pestivirus que provoca la enfermedad de Border en los corderos presenta reacción cruzada con el virus de la BVD. Los bovinos pueden infectarse de forma natural y se ha demostrado la transmisión del virus de la BVD de bovinos a ovinos. Algunas cepas inoculadas en cerdos pueden dar reacción cruzada en el diagnóstico de la peste porcina y pueden proteger contra inoculaciones posteriores de dicho virus.

El virus de la BVD se transmite por contacto directo y por transmisión transplacentaria. Actúan como fuente de infección descargas nasales, saliva, semen, heces, lágrimas y leche.

Los animales con infección persistente son la principal fuente del virus para los animales no inmunizados.

Los animales susceptibles, recién introducidos al rodeo, generalmente vaquillonas, se infectan por contacto con animales con viremia persistente, pudiendo ocurrir grandes pérdidas económicas si se encuentran en una etapa vulnerable de la gestación. La introducción de vacas o vaquillonas con viremia persistente desconocida en un rodeo susceptible puede también producir grandes pérdidas económicas.

El feto puede infectarse por vía transplacentaria a partir de la madre infectada en formas transitoria o permanente. Las epidemias de abortos y defectos congénitos en terneros de rodeos previamente libres del virus fueron provocados por la introducción de animales infectados.

Las hembras con viremia persistente pueden permanecer clínicamente normales durante varios años, produciendo durante este período, crías normales, aunque todos se encuentren con viremia persistente. De esta forma se puede establecer una familia con viremia maternal que puede persistir varias generaciones, manteniendo al virus en forma endémica en el rodeo.

Un toro con viremia persistente puede excretar el virus en el semen durante un tiempo indeterminado, y si se introduce en un rodeo susceptible puede tener efectos inmediatos e indeseables sobre la reproducción. Las vaquillonas no expuestas previamente al virus no conciben tras la cubrición por toros con infección persistente hasta que experimenten seroconversión.

Las pérdidas económicas asociadas a la introducción del virus de la BVD en un rodeo susceptible son debidas a abortos, defectos congénitos, mortinatos, mortalidad

neonatal, retraso en el crecimiento perinatal y postnatal, fallas reproductivas por infertilidad, muertes y el sacrificio temprano de animales con infección persistente.

La magnitud de las pérdidas puede fluctuar, siendo relativamente grandes cuando la enfermedad se presenta con carácter endémico, tras la transmisión horizontal inicial a vacas preñadas no inmunes y siendo considerablemente menores cuando la infección endémica persiste en el rodeo por la presencia de familias virémicas. Puede haber una fase posterior de grandes pérdidas si las vaquillonas llegan a la edad reproductiva sin haber sido expuestas al virus, ya sea naturalmente o por medio de la vacunación.

PATOGENIA.

La frecuencia de viremia, la capacidad del virus para comprometer el sistema inmune, la frecuencia de infección transplacentaria, la inducción de inmunotolerancia y la aparición de la inmunocompetencia fetal alrededor de los 180 días de gestación, son los principales hechos que condicionan la patogenia de la enfermedad. La infección puede originar cualquiera de los siguientes cuadros:

INFECCION POSTNATAL

- Diarrea vírica bovina
- Inmunosupresión
- Diarrea de los neonatos
- Fallas reproductoras

INFECCIONES FETALES

- Viremia persistente
- Enfermedad de las mucosas
- Enfermedad congénita

INMUNOLOGIA.

El virus de la BVD suele inducir títulos altos de anticuerpos neutralizantes en el suero que persisten durante largo tiempo. Sin embargo, el virus perdura en ocasiones sin anticuerpos circulantes, probablemente debido a tolerancia inmunológica o a destrucción de células inmunocompetentes. Se ha demostrado tolerancia inmunológica al virus.

MANIFESTACIONES CLINICAS.

La presentación como diarrea vírica bovina, es una infección aguda en bovinos de 6 meses a 2 años, siendo además, seronegativos e inmunocompetentes.

Tras la infección ocurre una viremia que dura hasta 15 días. El período de incubación es de 5 a 7 días tras lo cual ocurre viremia, leucopenia y fiebre transitorias. Se observa depresión, anorexia, descarga oculonasal serosa, diarrea de moderada a severa o intermitente, taquipnea y ulceraciones pequeñas de 1 a 3 mm de diámetro, irregulares en los labios y encías; gingivitis y puede haber pequeñas úlceras en la lengua, principalmente en los laterales y parte anterior de la misma.

La diarrea puede ser sanguinolenta y pueden observarse petequias y equimosis en la mucosa bucal, conjuntival y rectal. El curso de la enfermedad es de 10 a 18 días. La morbilidad es de 70 al 100%, mientras que la mortalidad es, del 0 al 2% dependiendo de la asociación con otras enfermedades por el efecto inmunosupresor del virus.

Cuando los fetos bovinos se infectan in útero, se produce el fenómeno de inmunotolerancia, nacen viables pero incapaces de desarrollar anticuerpos contra la cepa no citopática de virus, aunque sí pueden producir anticuerpos contra otros antígenos y contra otras cepas heterólogas de virus de BVD. Estos animales que

llegan muchas veces a adulto y son reproductores, nacen con el virus en su organismo y sufren infecciones con viremia persistente, alternando largos períodos de viremia con otros más cortos sin la enfermedad. Estos animales son seronegativos, excepto que exista una reinfección con una cepa heteróloga de virus de BVD, en cuyo caso este animal tendrá una infección y viremia persistente con la cepa no citopática y anticuerpos contra la cepa heteróloga que lo sobreinfectó. Este animal, al igual que todos los infectados persistentes es eliminador de virus al medio ambiente, infectando animales susceptibles que conviven con ellos.

Los infectados persistentes son la principal fuente de virus y diseminadores de la enfermedad, representan entre un 0,8 a 2%. Estos animales son los más importantes desde el punto de vista epidemiológico.

La presentación de enfermedad de las mucosas ocurre en bovinos de 6 meses a 2 años, que son inmunotolerantes - infectados persistentes por una cepa no citopática de virus de BVD y que sufren una sobreinfección con otra cepa citopática homóloga de virus de BVD. Son casos esporádicos, con signos clínicos severos y lesiones anatomopatológicas típicas de la enfermedad. Esta forma es de baja morbilidad y alta mortalidad (100%). Como principales signos se presentan depresión, debilidad, anorexia, taquipnea y taquicardia, emaciación, deshidratación con acidosis metabólica, úlceras bucales bien evidentes en labios, encías, lengua, comisuras de los labios, rodetes dentarios, paladar duro, etc.

También hay lesiones en ollares y morro, vulva y pezones. Puede haber lagrimeo y edema corneal. Es frecuente la renguera por la laminitis y las lesiones erosivas y necróticas en el espacio interdigital. Se presenta un cuadro febril con temperatura de

hasta 41°C.

Hay diarrea profusa acuosa 2 o 3 días después de iniciado el cuadro febril, que puede ser maloliente, acuosa hasta sanguinolenta. En la necropsia se encuentra lesiones ulcerativas en todo el tracto digestivo, hemorragias en estrías en el recto, los ganglios mesentéricos están agrandados y edematosos.

Son pocos los animales que enferman, no mueren y desarrollan la forma crónica. Se cree que son infectados persistentes con cepas no citopáticas que sufren sobreinfección con cepas citopáticas parcialmente homóloga a la primera. Se caracteriza por pérdida de peso y emaciación progresivas, anorexia y desmejoramiento general, hay diarrea intermitente. Puede haber timpanismo crónico por disminución de la motilidad del rumen. Una alta proporción de las infecciones por el virus de la BVD en bovinos susceptibles e inmunocompetentes son subclínicas, aproximadamente entre el 70 y 90%. En este caso hay elevación leve de la temperatura y leucopenia transitoria. Entre 2 y 4 semanas después de la infección aparecen en sangre los anticuerpos neutralizantes específicos. Esto explica la alta prevalencia de animales seropositivos en la población bovina en general.

Es difícil que el virus de BVD cause enfermedad en terneros que son inmunocompetentes, pero sí, en terneros que se infectan en el periparto. Los terneros nacidos con infección persistente son poco viables sufren neumonías y enteritis graves. En terneros de 4 a 6 meses de vida, calostrados, la infección es leve o subclínica.

Esta enfermedad puede estar asociada a trastornos de bajo porcentaje de concepción. La infección en la hembra gestante puede acarrear la infección fetal a

distintas edades de gestación con múltiples alteraciones, malformaciones congénitas, aborto, etc.

En el macho el problema está en le toro infectado persistente que eliminará importantes cantidades de virus con el semen, por lo que actúa como transmisor y diseminador de la enfermedad a las hembras susceptibles del rodeo. Desde el punto de vista epidemiológico es muy importante la identificación de los infectados persistentes y los crónicos.

PREVENCION Y CONTROL.

La recuperación de la infección natural generalmente confiere una inmunidad durable. Por otra parte, la administración parenteral de vacunas vivas atenuadas contra la BVD, solas o combinadas con IBR y PI3 también proporciona inmunidad satisfactoria. Sin embargo pueden ocurrir reacciones postvacunales, debiendo advertir también que las vacunas vivas están contraindicadas en animales durante la gestación. Los anticuerpos del calostro persisten al parecer durante cuatro a seis semanas en los terneros. Para asegurar la inmunización de estos animales, es necesaria la revacunación anual, que lleva a un alto grado de inmunización.

RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA.

Actualmente esta enfermedad es de distribución mundial, y se ha informado la presencia de la infección natural en caprinos.

Definición.

Es una enfermedad altamente infecciosa provocada por el *Alphaherpes virus* llamado herpesvirus bovino tipo 1. En los animales enfermos se observa rinotraqueítis, conjuntivitis y fiebre; la evolución es rápida y el curso de la enfermedad es corto, con

una alta tasa de recuperación. La encefalitis es la forma sistémica de infección en los neonatos y la vulvovaginitis pustular infecciosa es provocada por el mismo virus.

Epidemiología.

Todas las razas y las edades de bovinos son susceptibles a la enfermedad experimental. La enfermedad natural se observa principalmente, en animales de más de 6 meses de edad, quizás por hallarse más expuestos a la infección. No se registran variaciones estacionales en la incidencia, salvo en animales de engorde a corral en las épocas de otoño e invierno, cuando se concentra un gran número de animales susceptibles.

Rara vez la infección puede afectar a los cerdos, tanto en su forma respiratoria como genital; también son susceptibles los caprinos.

La tasa de morbilidad es del 8%, y la de mortalidad es de 3% en rodeos de leche. En rodeos de carne la tasa de morbilidad es del 20 al 30% y pocas veces llega al 100%. La tasa de mortalidad depende de la infección bacteriana secundaria en tráquea y bronquios y puede llegar al 10%, aunque, generalmente, no llega al 1%. Las tasas de morbilidad y mortalidad son más altas en rodeos de carne que en los lecheros, esto es debido al frecuente ingreso de animales susceptibles en una situación enzoótica.

Las fuentes principales de infección son el exudado nasal y aerosoles, secreciones genitales, semen, líquidos y tejidos fetales. La infección por aerosoles se considera la vía de contagio de la forma respiratoria; la transmisión venérea es la forma en que se propaga la forma genital de la enfermedad.

El virus de la IBR resiste la temperatura de congelamiento del semen (-196°C).

La incorporación de animales al rodeo precede el comienzo del brote de la

enfermedad. Los brotes suelen alcanzar su máxima intensidad en la segunda o tercera semana y terminada la cuarta o sexta.

Uno de los hechos más destacados del HVB 1 es su capacidad para permanecer latente tras la infección con una cepa de virulencia moderada del virus o tras la vacunación con una cepa adecuada. El parto y diferentes situaciones de estrés pueden estimular la reactivación y excreción viral. También se ha observado la excreción del virus en bovinos recuperados de la forma respiratoria de la enfermedad, y que meses después se infectaron con Dictyocaulus vivíparus. La placenta puede albergar al virus durante 90 días sin transmitirlo al feto. El recrudecimiento se puede diferenciar de la infección primaria y de la re-exposición por la vía intranasal basándose en la distribución de la actividad de los anticuerpos antivirales entre los serotipos séricos Ig M, Ig G_1 e Ig G_2.

La **inmunidad** de la IBR es compleja. Consiste en las relaciones entre anticuerpos locales y sistémicos, y la inmunidad mediada por células. Después de la infección natural o de la vacunación con vacunas a virus vivo modificado se activan los componentes celulares y humorales del sistema inmune. El nivel de inmunidad humoral se ha usado como indicador de infección previa, y como medida indirecta de la resistencia a la enfermedad clínica. La presencia de niveles de anticuerpos en el suero o secreciones nasales (como ocurre a los 7 días luego de la vacunación), sí produce grados variables de resistencia a la enfermedad clínica durante 9 meses.

La duración de la inmunidad por calostro varía entre 1 a 6 meses y depende del nivel inicial que se transfiera al ternero. La existencia de anticuerpos maternos en las crías bovinas tal vez obstaculice la vacunación de éstas, si se realiza antes de los 6 meses

de edad.

El virus de la IBR tiene un mecanismo particular de perpetuidad en el organismo conocido como estado de latencia. Ante factores estresantes (destete, traslados, lluvias prolongadas, frío o calor excesivos, escasa disponibilidad de alimentos, alta producción de leche, etc.) el virus aparece en circulación y alcanza los tejidos susceptibles desencadenando la enfermedad.

Patogenia.

Se reconocen 5 formas de presentación clínica de la IBR:

- Respiratoria
- Conjuntival
- Genital
- Inductora de aborto
- Encefalítica

Los virus de la vulvovaginitis pustulosa infecciosa (IPVV) y de la queratoconjuntivitis viral son idénticos al de la IBR.

- Forma respiratoria. Los signos varían de leve a graves. El período de incubación es de 4 a 6 días; hay comienzo súbito de fiebre alta. Los animales afectados presentan anorexia, depresión, secreción nasal, tos, respiran con la boca abierta, expulsan saliva espumosa y tienen hiperpnea y disnea. La mucosa nasal se inflama notablemente: "nariz roja". El exudado puede producir una membrana pseudodiftérica que cubre toda la pared de la tráquea y por lo tanto se dificulta la respiración. La viremia es de corta duración. También puede desarrollar estomatitis ulcerativa, principalmente en los laterales de la lengua, bordes de los labios y

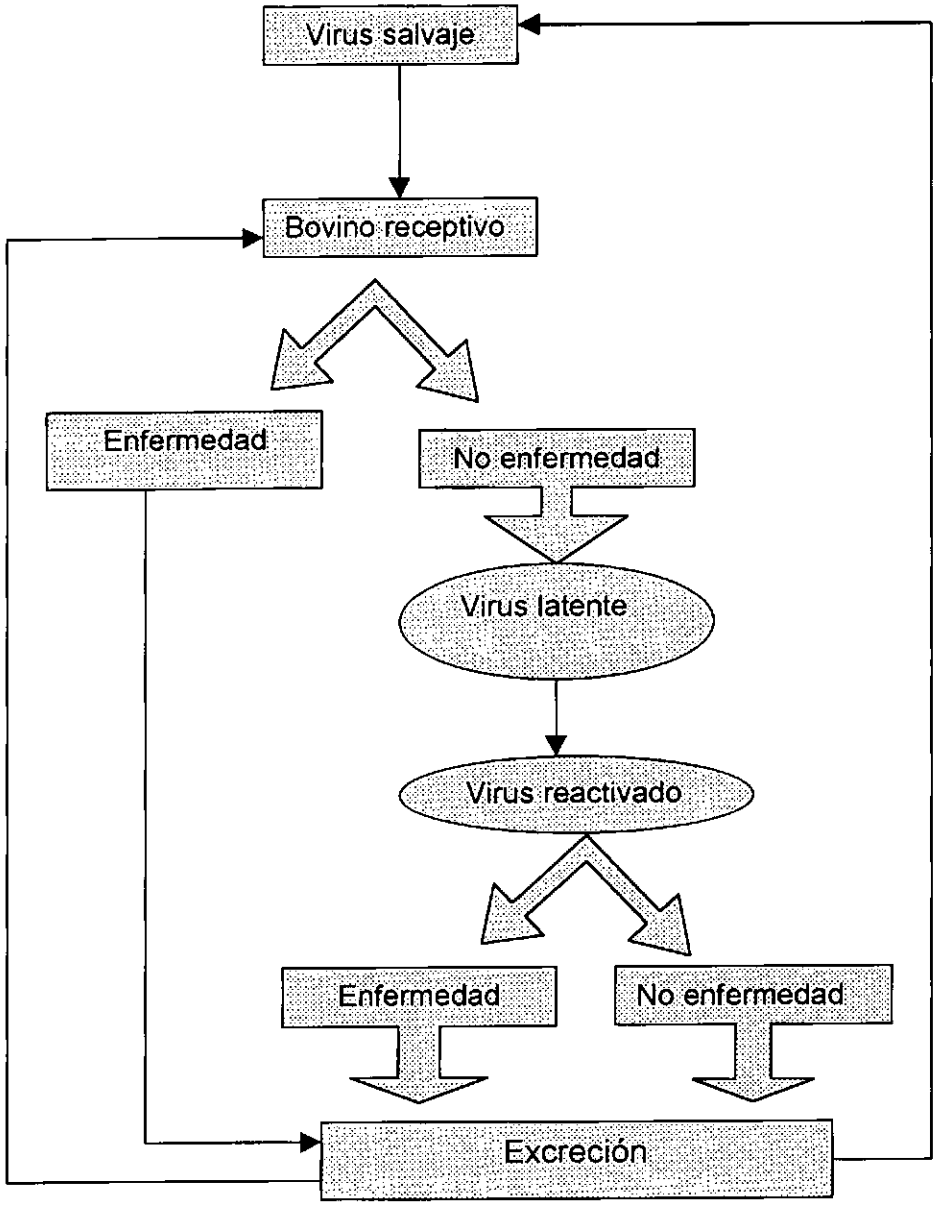
ollares. Puede haber desprendimiento del epitelio de los ollares y del morro. Se debe establecer el diagnóstico diferencial con fiebre Aftosa. El curso de la enfermedad es de 7 a 15 días. La morbilidad es alta(45-100%), y la permanencia de la enfermedad en una población es de 15 a 45 días. La mortalidad es baja del 0 al 1,5%.

- Forma genital. También denominada vulvovaginitis pustular infecciosa (IVP) o exantema vesicular coital. Los signos de esta enfermedad son elevación y movimiento en látigo de la cola, polaquiuria, hiperemia de la mucosa vulvaginal, secreción vaginal escasa y formación de pústulas. Esta forma puede afectar al útero directamente y predisponer a infección bacteriana secundaria de los órganos con metritis resultante y un período transitorio de infertilidad, pero no aborto. En el macho esta forma se denomina balanopostitis pustulosa infecciosa, con lesiones similares en el pene y prepucio que pueden causar parafimosis e impotencia coeundi. No se afecta la calidad del semen, ni tampoco la capacidad reproductiva del toro. Los toros pueden transmitir la infección sin manifestar signos de la enfermedad. La morbilidad es del 5 al 25% y la mortalidad del 2 al 20%.
- Forma conjuntival. En brotes naturales y en la enfermedad experimental, aparece en ocasiones conjuntivitis leve a grave, con o sin queratitis y lagrimeo, pudiendo ocurrir estas manifestaciones solas o junto con la forma respiratoria.
- Forma inductora de aborto. El aborto es una de las secuelas más importantes de la infección del virus de IBR. El feto bovino es susceptible durante toda la gestación al aborto por la acción del virus de la IBR, y puede ocurrir aborto durante los primeros 60 días de la infección. Después de infectar las vías respiratorias, el virus

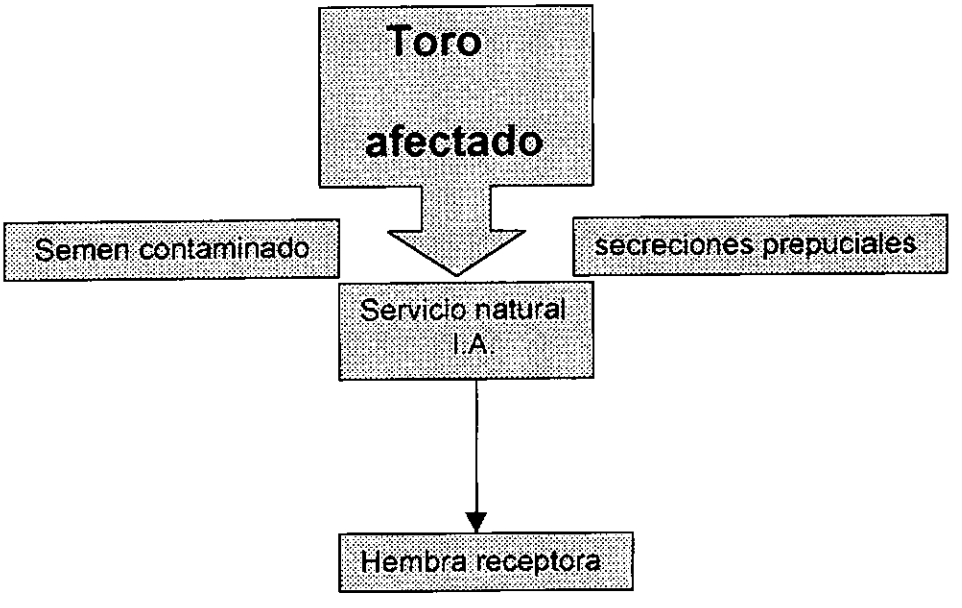
probablemente alcanza la corriente sanguínea en 4 o 5 días por vía de fagocitos y de conductos linfáticos, desaparece rápidamente de la sangre, ya que no puede ser recuperado luego de varios días. Los fetos mueren cuando son expulsados, y la placenta puede retenerse temporalmente. Durante la necropsia se encuentran grandes cantidades de líquidos peritoneal y pleural mezclados con sangre. La metritis es infrecuente y no conlleva a infertilidad posterior. Generalmente ocurre aborto en el último trimestre después de la exposición natural, y no antes del 5° mes después de la administración parenteral de la vacuna a virus vivo modificado.

- Forma encefalítica. Generalmente se presenta en terneros menores de 6 meses de edad, y se caracteriza por ataxia y depresión, con movimientos de rechinar de dientes, expulsión de espuma por la boca, convulsiones, posición echada y movimientos frenéticos incontenibles, el animal reacciona en forma exagerada al menor estímulo externo, se aparta del resto y manifiesta incoordinación motora. Tienen movimientos hacia lateral de la cabeza y presentan opistótonos. La fase de excitación dura de 24 a 36 horas, luego viene la fase de depresión donde no responden a los estímulos, pueden presentar ceguera central, esta fase dura entre 48 y72 horas; finalmente el animal permanece en decúbito lateral y muere. El curso es rápido y mortal, entre 72 y 96 horas.

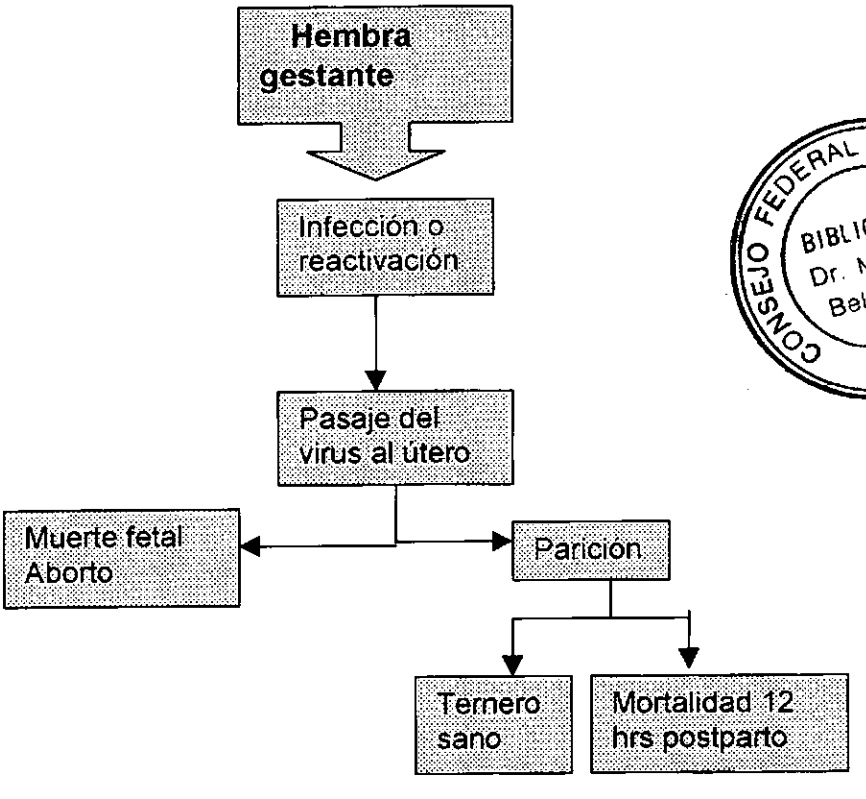
El **ciclo del virus** de la IBR puede esquematizarse de la siguiente manera:



La **transmisión por vía genital** tiene gran importancia y puede esquematizarse de la siguiente manera:



Es importante recordar que esta hembra si retiene la gestación presenta una **infección latente** que puede manifestarse de la siguiente manera:



CONSEJO FEDERAL DE INVERSIONES
BIBLIOTECA Dr. Manuel Belgrano

CAPITULO II. DEL LABORATORIO.

El Laboratorio del CREACyT cuenta con una sala de preparación de muestras, una sala de cultivo totalmente esterilizable y con un gabinete de flujo laminar, que constituye el sector de Brucelosis; y una sección de Serología con una sala de recepción y preparación de muestras, otra sala para microscopía y una cámara de frío.

Equipamiento y material del laboratorio:

- Centrífugas, para separar el suero o el plasma de los elementos formes de la sangre.
- Microscopios ópticos, de fluorescencia y de luz invertida. Lupas
- Estufas de cultivo; y Estufa de cultivo para anaerobiosis (equipada con tubos de CO2)
- Baños termostáticos, marca VICKING modelo MASSON.
- Autoclaves.
- Heladeras y freezer
- Gradillas de metal y de madera para las muestras que llegan al laboratorio.
- Tubos de ensayo de vidrio al borosilicato de diferentes capacidades: de 10 ml; de hemólisis.
- Tubos ependorf de plástico con tapa.
- Placas de Petri de vidrio y de plástico.
- Portaobjetos y cubreobjetos;

- Pipetas graduadas de 10,0; 5,0; 1,0; y de 0,2 ml.
- Pipetas de vidrio de Bang
- Pipetas automáticas de 10; 100 y 200 µl con tips descartables.
- Jeringas autodosificadoras graduadas.
- Aglutinoscopio: caja de madera, pintada de negro en su interior y equipada con luz.
- Placa de vidrio dividida en cuadrados de 3x3 cm., conteniendo un total de 60 cuadrados.
- Mezcladores de acrílico, plásticos y de alambre grueso, de 5 puntas cada uno.
- Reloj alarma y timer de 60 minutos.
- Frascos para contener drogas, erlenmeyers, matraces, probetas, vasos de precipitación.
- Goteros para antígenos: calibrados para 0,03 ml. por gota.

Lavado del material de vidrio:

Todo el material que estuvo en contacto con sangre, suero o plasma, debe descartarse en bateas con una solución de lavandina, y dejarse en contacto durante al menos 12 horas.

Para realizar el lavado general del material de vidrio, se utiliza detergente no iónico tipo Extran (Merck), enjuagues sucesivos con agua corriente y luego destilada. Si el material está engrasado o con restos de suero, sangre, se debe proceder a un lavado

con mezcla sulfocrómica y/o potasa alcohólica o bien alcohol - ácido.

Esterilización del material de laboratorio.

En al aire, en el agua y en la tierra se encuentran microbios patógenos y saprófitos que aprovechan las sustancias nutritivas a su alcance para desarrollarse, su enorme cantidad hace que no pueda considerarse ningún punto libre de gérmenes. Esta hecho crea grandes dificultades en los estudios bacteriológicos, cuando es necesario obtener los gérmenes en estado de pureza. Tanto el instrumental del laboratorio como los medios de cultivo son invadidos con suma facilidad por los microbios del medio ambiente.

Para subsanar estos inconvenientes se realiza la **esterilización**, por distintos métodos:

- Calor seco
- Calor húmedo
- Filtración
- Métodos mixtos.

Las técnicas de esterilización y manejo de instrumental de siembra y cultivo consultarlo en el manual de procedimientos MICROBIOLOGÍA DE LECHES, Capítulo 5.

CAPITULO III. DE LAS SOLUCIONES.

Antígenos y soluciones utilizados durante el diagnóstico serológico de brucelosis.

- Antígenos: los antígenos utilizados pueden ser producidos por el SENASA o por laboratorios privados, en este caso deben estar controlados por el ente oficial y presentar la etiqueta que acredita este control. Todos los antígenos deben contener fecha de vencimiento y serie de producción.

El SENASA controla:

- **Concentración celular.**
- **pH.**
- Sensibilidad.
- **Disociación.**
- **Pureza.**
- Esterilidad.

Antígeno de BPA.

El antígeno que se utiliza tiene un pH de 4 y el volumen celular es del 11 %.

El bajo pH, favorece la aglutinación de las inmunoglobulinas del tipo Ig G1.

El antígeno debe conservarse entre 4 y 8 °C, si se lo congela queda inutilizado.

Antígeno de Wright para la prueba lenta en tubo.

El volumen celular del antígeno es de 4,5% y el pH de 6-7.

Antígeno para Rosa de Bengala.

El antígeno que se utiliza tiene un volumen celular el 8 % y un pH de 3,65.

Precauciones: el antígeno se debe conservar entre 4 y 8 °C, si se congela queda

inutilizado.

Antígeno para PAL.

El antígeno que se utiliza es una suspensión de Brucella abortus cepa 1119/3 teñidas de violeta con hematoxilina, normalizadas a un título de 1/50 contra sueros patrones, lo que da una concentración celular del 4% y un pH de 4.

- Soluciones requeridas para el diagnóstico serológico.

Solución salina normal 0,85%.

- Material de vidrio:

Matraz de 1000,00 ml.

Vasos de precipitación 1000 ml

Varilla de vidrio.

- Drogas necesarias:

Cloruro de sodio, p.a. secado a 200°C en estufa.

Agua destilada.

- Preparación:

Pesar 8,50 g de NaCl, y disolverlo con 500 ml de agua destilada en vaso de precipitación, agitando vigorosamente. Trasvasar cuantitativamente a matraz aforado de 1000,00 ml, completar a volumen con agua destilada.

Solución salina fenolada 0,5%.

Esta solución debe prepararse por lo menos con 48 horas de anticipación a la

realización de las pruebas.

- Material necesario:

Balanza analítica.

Pipetas de 1 ml.

Vaso de precipitado de 100,00 ml.

Matraz de 100,00 ml.

- Drogas requeridas:

Fenol pureza 99%, marca Merck.

Agua destilada.

Solución salina normal 0,85% (SSN), Frasco color caramelo,

A. Preparación de la solución de fenol:

Pesar 50 g de fenol pureza 99%, marca MERCK, disolver en vaso de precipitado con 50 ml de agua destilada y poner a calentar hasta la homogeneización de la solución. Guardar en frasco de vidrio color caramelo.

B. Preparación de la solución salina fenolada 0,5%:

En una matraz de 100,00 ml colocar 0,5 ml de la solución A. de fenol. Completar a volumen con soloución salina normal 0,85%.

Solución de 2-mercaptoetanol. 0,1M

- Material necesario:

Frasco color caramelo.

Pipeta automática de 1,00 ml.

Matraz de 100,00 ml.

- Drogas utilizadas:

2- Mercaptoetanol solución comercial de concentración 99% pa.

SSN 0,85%.

- Preparación:

En el matraz, colocar 0,78 ml de 2- mercaptoetanol, agregar SSN hasta completar volumen. Tapar y homogeneizar por movimientos rotatorios y de inversión.

Trasvasar a frasco de vidrio color caramelo, guardar a 4 °C y al resguardo de la luz.

Recordar que su duración es de 15 días.

Antígeno de Wright al 2%.

- Material necesario:

Matraz de 100,00 ml,

Pipeta de 2 ml,

Frasco color caramelo,

- Drogas necesarias:

SSN 0,85%,

Antígeno de Wright.

- Preparación:

Con la pipeta tomar 2,00 ml de antígeno de Wright y colocarlo en el matraz aforado. Completar volúmen con solución salina normal 0,85%. Trasvasar la solución de antígeno en frasco caramelo y homogeneizarla el realizando suaves movimientos de inversión y circulares.

Reactivos necesarios para la coloración de Gram - Kopeloff y Beerman:

1. Solución de violeta de genciana alcalina:

A)

Violeta de genciana 1,00 g

Agua destilada c.s.p. 100,00ml

B)

Bicarbonato de sodio 1,00 g

Agua destilada c.s.p. 20,00 ml

Mezclar 30 gotas de A) y 8 gotas de B) en el momento de usarlo.

2. Solución iodoiodurada:

Yodo metálico 2,00 g

Soluc normal de hidrato de sodio 10,00 ml

Agua destilada csp 100,00 ml

3. Solución de fucsina:

Fucsina básica 0,10 g

Agua destilada csp 100,00 ml

Medios de cultivo utilizados durante el proceso de diagnóstico bacteriológico de brucelosis.

Para el diagnóstico y cultivo de Brucella sobre todo de los tipos patógenos Brucella melitensis, abortus y suis, a partir del material clínico o de aislamientos de origen

animal, según Wundt(1957) modificado.

Según Kuzdas y Morse (1953), Renoux (1954) y Weed (1957), en el caso de material de investigación muy contaminado y con el fin de inhibir la flora acompañante, puede añadirse a este medio de cultivo Bacitracina, Polomixina, Cicloheximida y eventualmente Violeta de etilo.

Es posible hacer una diferenciación de las diversas especies de Brucella, partiendo de hecho entre otros, de su distinta sensibilidad frente a los colorantes como la Fucsina y la Tionina. Añadiendo estos últimos al agar Brucella pueden prepararse los correspondientes medios de cultivo diferenciales.

Agar para Brucella (APB).

Composición de agar Brucella (Merck) utilizado en el Laboratorio: (g/lt).

Peptona de carne	10,00
Peptona de caseína	10,00
Extracto de levadura	2,00
D(+)glucosa	1,00
Cloruro de sodio	5,00
Agar agar	13,00

- Material necesario:

Matraz aforado de 1000,00 ml.

Pipeta de 10,00 ml.

Placas de petri.

Balanza analítica.

- Drogas utilizadas:

Agar para Brucella, MERCK.

Agua destilada.

Peparación:

Pesar 41,00 g de agar Brucella y colocarlo en el matraz aforado de 1000,00 ml.

Completar volumen con agua destilada.

Mezclar agitándolo. Llevar a fuego directo hasta la clarificación de la mezcla.

Esterilizar en autoclave, 15 minutos a 121°C.

Dejar enfriar hasta 45- 50 °C.

Con una pipeta colocar de agar en cada.

Tapar la placa y dejar solidificar.

Las placas con medios de cultivo son claras y amarillentas.

Preparación del agar selectivo para Brucella:

Preparar el agar para Brucella según la descripción anterior

Esterilizar y dejar enfriar a 45-50°C.

Incorporar las siguientes sustancias en forma aséptica, obtenidas por filtración estéril:

Bacitracina	6000,00UI/lt de agar
Sulfato de Polimixina B	25000,00 UI/lt de agar
Cicloheximida	100,00 mg/lt de agar
Violeta de etilo(eventualmente)	1,25 mg/lt de agar

El agar para Brucela y el agar selectivo para Brucella son los que se emplean en el Laboratorio. A continuación se presentan otros medios opcionales:

Caldo triptosa. Agar triptosa.

Par enriquecimiento, aislamiento, cultivo y diferenciación sobre todo de *Brucella*, pero

también de *Estreptococos*, *Pneumococos*, *Meningococos*, *Listerias*, *Pasteurella.*

Otras posibilidades de empleo: para la preparación de Antígenos según el método de Silverman y Elberg, 1950.

Composición (gr/lt):Triptosa	20,00
D+ glucosa	1,00
ClNa	5,00
Dicloruro de tiamina	0,005

Adicionar agar para el caso de la preparación de agar triptosa.

Preparación :

Disolver 26,00 gr/lt , colocarlo en una matraz aforado y llevar a fuego directo para homogeneizar la solución. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

Controlar el pH: 7,3+/-0,1.

Los medios son claros e incoloros.

Preparación del Agar- violeta cristal- triptosa: antes del autoclavado se incorporan y mezclan homogéneamente 1,4 ml de una solución acuosa de 0,1% de Violeta cristal. Para cultivo selectivo de Brucella.

Preparación del Agar sangre triptosa: el medio de cultivo estéril, fundido, se enfría a 45-50°C luego se incorpora 5% de sangre desfibrinada, estéril sin espuma.

empapadas con solución de colorantes o discos de papel de filtro también empapados con los colorantes.

Características de los ingredientes utilizados para el cultivo de Brucella.

Agar agar: es el agente gelificante para la preparación de medios de cultivo microbiológicos.

Se obtiene a partir de ciertas algas rojas marinas, es un poligalactósido y la inmensa mayoría de los microorganismos son incapaces de degradarlo. El que se utiliza en microbiología es purificado. Una solución de 12,00 g/lt en agua desmineralizada o destilada tiene el aspecto de gel claro en el recipiente de cultivo.

El punto de solidificación es de 32 a 36°C.

Extracto de levadura: se obtiene por extracción acuosa de la levadura de cerveza autolisada. Por su elevada cantidad de vitaminas, ofrece excelentes condiciones de crecimiento a una amplia series de microorganismos. Por lo general se incorpora a los medios de cultivo en el orden de los 3,00 g/lt como fuente de vitaminas .

Peptona de carne: puede ser obtenida por degradación proteolítica de la carne mediante pepsina o por la degradación de la tripsina.

Peptona de caseína: puede obtenerse por hidrólisis pancreática a partir de la caseína. Sirve para la preparación de los medios de cultivo para microorganismos exigentes. También puede obtenerse por degradación proteolítica de la caseína por tripsina.

Triptosa: es una peptona mixta con altas proporciones de proteínas disgregadas por tripsina. Se usa para cultivo de microorganismos exigentes para la preparación de agar sangre.

Soluciones utilizadas para el diagnóstico de parasitosis.

Se describen detalladamente las soluciones de cloruro de sodio y la solución de flotación ya que son las utilizadas en el laboratorio

Solución de cloruro de sodio:

- Material necesario:

Densímetro.

Vaso de precipitado de 250 ml.

Varilla de vidrio.

- Drogas utilizadas:

Agua destilada.

Sal común o cloruro de sodio p.a., calentda a 200°C.

- Preparación:

En el vaso de precipitado, colocar 200,00 ml de agua destilada, agregar sal común o NaCl p.a a saturación. Disolver con una varilla de vidrio. Obtener una densidad de 1,20.

Solución de flotación:

- Material necesario:

Densímetro.

Vaso de precipitado de 100 ml.

Probeta de 500,00 ml.

Varilla de vidrio.

Drogas requeridas:

Agua destilada

Sal común o cloruro de sodio, previamente secado en estufa a 200°C.

Cloruro de zinc.

- Preparación:

A) solución saturada de cloruro de zinc,

En un vaso de precipitado colocar 100,00 ml de agua destilada

Agregar cloruro de zinc a saturación. Homogeneizr con la varilla de vidrio.

B) solución saturada de cloruro de sodio .

En un vaso de precipitado, colocar 100,00 ml de agua destilada

Con una cuchara de vidrio, colocar sal común o cloruro de sodio pureza 99% a saturación hasta obtener una densidad de 1,30.

Solución de flotación:

En una probeta colocar una parte de la solución A) y dos partes de la solución B).

Colocar la solución en un frasco para su conservación.

Se nombran las siguientes soluciones como opcionales

Solución detergente:

Detergente concentrado: 5,00 ml.

Agua: 995,00 ml.

Alumbre férrico: 8 gotas.

Solución de soda cáustica decimonormal.

Solución de Hidróxido de sodio 0,4 N.

Solución de pepsina:

Pepsina: 10,00 g.

Ac. clorhídrico: 30,00 ml.

Agua: 1000,00 ml.

Soluciones utilizadas para el diagnóstico de Trichomoniasis Bovina.

Medios de transporte.

Bartlett, Hasson y Teeter recomiendan la refrigeración de las muestras para aquellos casos en que no se puede examinar o cultivar en forma inmediata, considerando como plazo máximo 18 horas.

Fitzgerald, Hammond y Shupe demostraron la eficiencia de la refrigeración a 4°C de las muestras, con respecto a otras conservadas a temperatura ambienta. En ambos casos, la siembra posterior en medios de cultivo fue superior a la observación directa.

Todorovic y Mc Nutt estudiaron el comportamiento de los diferentes medios basándose en leche mantenidos a temperatura ambiente y refrigerados, con posterior incubación a 37°C. Ellos concluyeron que con la leche descremada se obtienen los mejores resultados.

En cuanto al medio de Trichomona Oxoid no hay diferencias entre refrigerarlo o no previamente a la incubación.

Los medios de transporte más utilizados son:

- Solución fisiológica tamponada con 5% de suero bovino,
- solución Ringer Lactato,
- Medio de Kupferberg,
- Leche descremada.

El medio de leche descremada con antibióticos y suero presenta un excelente porcentaje de recuperación luego de 24 horas de transporte.

Medios de cultivo.

El desarrollo del flagelo en medios apropiados es de gran importancia, pues la eficiencia del diagnóstico está basada en la elección de un buen método de muestreo y cultivo posterior.

Si bien son muchos los medios que se pueden utilizar, hay que tener en cuenta su eficiencia, bajo costo y fácil preparación.

Por las características bioquímicas del parásito, casi todos los medios deben tener un hidrato de carbono y una fuente proteica además de sustancias reductoras de la tensión de oxígeno, por ser anaerobio tolerante; de allí que la mayoría de los autores insisten en recomendar que el envase de los medios debe ser un tubo con tapa a rosca.

Otro factor es la adición de suero inactivado para destruir las aglutininas que pudiera tener. Existen medios que se enriquecen con yema de huevo en porcentajes similares al suero, con buenos resultados.

La adición de antibióticos y fungicidas es una condición importante para inhibir el desarrollo bacteriano ya que la fase de división binaria del parásito es muy lenta. Por lo tanto hay que evitar que las bacterias compitan por el sustrato, alterando las tensiones de oxígeno y produciendo metabolitos tóxicos que impidan el buen desarrollo del parásito. Considerando la población normal bacteriana en prepucio y las condiciones de trabajo a campo, se deberá poner énfasis en obtener muestras limpias, sin tierra y sin heces, ya que contaminan rápidamente los medios. La elección de los antibióticos es importante teniendo especial cuidado en emplear productos de calidad probada.

Los medios de cultivo que mejores resultados han tenido son los siguientes:

- Medio de Plastridge modificado por Sutherland, Simmons y Bell.
- Medio de Plastridge modificado por Fitzgerald y col.
- Medio de Diamond modificado por Abbit y Ball.
- Medio de thioglicolato enriquecido con suero al 10%.
- Trichomona medio Oxoid.
- Medios con leche descremada.
- Medio Macrotric.

Los medios con leche descremada son muy difundidos por su fácil preparación y bajo costo; la leche en polvo que se utilice no debe estar vencida, ya que produciría un crecimiento deficiente. También es importante que a un medio como éste se le agreguen antibióticos, por la gran facilidad con la que se contaminan.

Las muestras deben incubarse a 37°C durante 8 días, si la población es abundante, lo usual es que el cultivo de positivo entre los días 2 y 5 de incubación.

Para aquellos medios que tienen agar en su composición se procederá a su fraccionamiento cuando éste se encuentre bien disuelto. Si se fracciona en frío y el agar no se distribuyó bien, habrá fallas en el crecimiento, pues el agar baja la tensión de oxígeno, favoreciendo la microaerofilia y por ende el desarrollo.

Cuando se efectúe la observación microscópica del medio de cultivo se tomará en cuenta que el desarrollo de T. foetus tiende a ocupar la parte inferior del envase, por lo que es conveniente homogeneizar el contenido.

<u>Caracterización de medios de transporte y de cultivo utilizados para el diagnóstico de la Trichomoniasis bovina.</u>

Se describen detalladamente la preparación de los medios de cultivo de leche

descremada y del medio Macrotric por ser los que se preparan en el Laboratorio.

Leche descremada.

- Material necesario:

Matraz aforado de 1000,00ml.

Vaso de precipitado de 100 ml.

Frascos de 5- 7 ml, con tapa a rosca.

- Drogas requeridas:

Leche en polvo descremada.

Suero bovino o equino estéril e inactivado.

Penicilina.

Estreptomicina .

Nistatina.

Agua destilada estéril.

Preparación:

Hidratar la leche en polvo descremada en elvaso de precipitado, disolver por calentamiento suave y colocar 100,00 ml en un matraz aforado de 1000,00 ml. completar el volumen con agua destilada esteril.

Una vez enfriada la solución de la leche agregar suero bovino o equino estéril e inactivado 100,00 ml; penicilina 1000,00 UI/ml; estreptomicina 1,00 mg/ml y nistatina 500,00 UI/ml.

Fraccionar a razón de 3,00 ml en envases con tapa a rosca de 5-7 ml de capacidad.

Verificar la fecha de vencimiento de la leche en polvo que se utiliza.

- Medio Macrotric.

Materiales necesarios:

Embudo.

Algodón.

Vaso de precipitado de 2000 ml, 100 ml .

Balanza.

Drogas y material biológico necesarios:

Hígado bovino.

Agua destilada.

Peptona .

Suero bovino inactivado a 56°C por 30 minutos .

Cloruro de sodio .

Glucosa .

Agar nutritivo.

Preparación:

1. Pesar 500,00 g de hígado bovino y colocarlo en un vaso de precipitado de 2000 ml agregar 1000,00 ml de agua destilada.
2. Calentar a 50°C por 1 hora.
3. Hervir a ebullición por 30 minutos.
4. Filtrar a través de un embudo con algodón en su interior. Dejar enfriar la preparación.
5. Disolver 10,00 g de peptona en 1000,00 ml de agua destilada y agregar al vaso de

precipitado que contiene el hígado.

6. Agregar 100,00 ml de suero bovino inactivado .
7. Pesar 5,00 g de Cl Na, 6,00 g de glucosa.
8. Agregar al vaso de precipitado.
9. Pesar 3,00 g de agar nutritivo, disolver y calentar el agar en agua destilada, hasta trasparencia
10. Agregar el agar a la preparación del hígado.
11. Dejar enfriar .
12. Colocar 3,00-4,00 ml en frascos de 6- 7 ml con tapa a rosca.

Los siguientes métodos se presentan como opcionales:

Solución tamponada de Sorensen.

Fosfato disódico anhidro	8,33 gr.
Fosfato monopotásico anhidro	1,09 gr
Agua destilada csp.	1000m00 ml
pH final	7,6

- Solución fisiológica tamponada.

Solución fisiológica 0,85%	1840,00 ml
Sol. Tamponada de Sorensen	160,00 ml
pH final	7,4

- Medio de Diamond modificado por Abitt y Ball.

Tripticasa	2,00 gr
Extracto de levadura	1,00 gr
Maltosa	0,5 gr
L-hidrocloruro de cisteína	0,1 gr
Ac. L-ascórbico	0,02 gr
Fosfato dipotásico	0,08 gr
Fosfato monopotásico	0,08 gr
Agar	0,05 gr
Agua destilada	90,00 ml
PH	7,2-7,4
Suero bovino estéril	10 %
Penicilina	1000,00UI/ml
Estreptomicina	1,00 mg/ml

Esterilizar a 121°C por 10 minutos.

El suero bovino debe inactivarse a 56°C por 30 minutos.

El medio se fracciona en volúmenes de 10 ml en tubos de 15 x 125 mm con tapa a rosca.

- Medio de Plastridge modificado por Sutherland.

Infusión de hígado	450,00g/1000 ml
Bacto peptona	10,00 g
Agar	3,00 g

PH	7,4
suero bovino estéril	8,00 ml
Penicilina	1000,00 UI/ml
Estreptomicina	1000,00 UI/ ml
Nistatina	200,00 UI/ml

La infusión de hígado puede reemplazarse por Bactoliver "Diftco":122,00 g/ml.

El suero se agrega al momento de usar.

Se esteriliza a 121°C por 15 minutos y se fracciona en volúmenes de 8 ml en frascos de tapa a rosca de 30 ml de capacidad.

- Medio de Plastridge modificado por Todovoric y Mc Mutt.

Peptona	10,00 g
Dextrosa	10,00 g
Extracto de carne	3,00 g
Cl Na	1 g
Agar	0,8 gr
Agar	0,8 g
Agua destilada csp	1000,00 ml
PH	7,2 - 7,4
Suero bovino estéril	10 %
Penicilina G	1000,00 UI/ml

Dihidroestreptomicina 1,00 mg/ml

Fraccionar en volúmenes de 8 a 10 ml en envases con tapa a rosca de 16 x 125 mm.

El medio se debe esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Soluciones utilizadas para el diagnóstico de Vibriosis Bovina.

Medios de transporte.

Estos se utilizan cuando las muestras no pueden ser enviadas dentro de las 6 a 8 horas posteriores a la recolección.

Se describen los dos medios de transporte que más se utilizan.

Medio de transporte SBL.

Descripto por Gastrin (1968), el cual no es más que un medio de Stuart modificado.

Fórmula:

Bacto-agar----------9,00 g

Ac. Thioglicólico--------0,5 ml

Glicerofosfato de Na----10,00 g

Cloruro de Calcio 1%----10,00 g

Clorhidrato de Cisteína---250,00 mg

Azul de Metileno 0,1%-----2,00 ml

Agua destilada csp----------950,00 ml

pH = 7,2

Procedimiento:

1. Fundir el Bacto-agar solo agregándole 200,00 ml de agua destilada y luego ir incorporando el resto del agua destilada.

2. Preparar una solución con el resto de los elementos y luego verterlo en el Bacto-agar fundido.
3. Envasar en frascos tapa a rosca de boca ancha de 30 ml de capacidad, realizar vacío hasta 10 mm de Hg y luego cuatro pasajes de nitrógeno.
4. Taparlos bien y esterilizarlos a 120°C durante 15 a 20 minutos.
5. Guardar los frascos a temperatura ambiente y utilizarlos dentro del mes de preparados.

Desechar todos aquellos frascos que mostrasen una coloración azul de más de 5 mm en la parte superior del medio, lo que indica oxigenación del mismo

El medio de transporte TEM.

Permite un incremento del número de C. fetus, así como también disminuye los contaminantes.

Abundantes organismos son detenidos con un inóculo de 10000, aún después de transportar la muestra a 22- 23°C por 4 días. Puede aislarse del medio conservado entre 2 y 23°C durante 2 días, aún con un inóculo tan pequeño como 100 células totales.

El medio se prepara en frascos ampollas de 30 ml con tapón de goma. Se introducen 10,00 ml de suero bovino esterilizado por filtros de Seitz y descomplementado a 56°C durante 30 minutos

Agregar la mezcla antibiótica que se detalla a continuación por cada ml de suero:

300,00 ug de fluoruracilo

100,00 UI de Sulfato de Polimixina B

50,00 ug de Verde Brillante

3,00 ug de Acido Nalidíxico

100,00 ug de Cicloheximida

Introducir los frascos dentro de un baño de agua hirviendo por 2 minutos. Esto hace que el medio se solidifique y adquiera un color azul-verdoso.

Dejar que se enfríe

Homogeneizar el material mediante una varilla de vidrio estéril.

Introducir una aguja calibre 18 a través del tapón de goma, el cual está fijado mediante un precinto.

Depositar los frascos en una jarra, a la cual se le reemplaza el vacío mediante el aire por una mezcla gaseosa compuesta de 2,5 % de oxígeno, 10 % de dióxido de carbono y 87,5 % de nitrógeno.

Posteriormente abrir la jarra y retirar las agujas inmediatamente.

Incubar los frascos a 4°C, por lo menos una semana, antes de ser utilizados. En este período de almacenamiento el medio adquiere una coloración verde opaca. Este medio puede ser conservado en el refrigerador por 3 meses. Se recomienda usar dos medios de transporte por cada muestra.

Las secreciones prepuciales se centrifugan a 1200 RPM durante 5 minutos y 1,00 ml del líquido sobrenadante se inocula en el medio TEM mediante una aguja y jeringa estériles, teniendo en cuenta la precaución de no introducir el aire o mover las tapas.

El material puede ser mantenido con un alto grado de recuperación durante dos días de transporte, a temperaturas que oscilan entre 18 y 37°C (tener cuidado con las temperaturas inferiores a 5°C).

Cuando las muestras llegan al laboratorio, los frascos se incuban a 37°C durante 4 días. Posteriormente se le adicionan 2,00 a 3,00 ml de solución fisiológica estéril, se mezcla y todo el líquido disponible se aspira mediante una pipeta de 10 ml. Luego las muestras se siembran en agar sangre con antibióticos.

Preparación de los hisopos para la prueba de mucoaglutinación.

1. Se preparan hisopos que entren cómodamente por la boca del frasco.
2. Se hierven durante 5 minutos en solución de Sorensen fosfato-buffer; pH 7,2.
3. Secar.
4. Se colocan en tubos de ensayo y se esterilizan a 120°C durante 20 minutos.

Al utilizarlos se embeben en el líquido sobrenadante de muestreo prepucial, que se centrifugó a 1200 RPM por 5 minutos y posteriormente se los introduce a 4,5 cm de profundidad del medio, sin tocar las paredes. Los medios se utilizan para transportar las muestras por espacio de 24, 48 o 72 horas a 4-6°C. Luego de ese período de transporte se extiende el hisopo en una placa de agar-sangre con antibióticos.

Con el medio de transporte TEM *Pseudomonas, Proteus mirabilis* y *C. bubulus* son contaminantes comunes, con este medio se ven notablemente reducidos.

El medio SBL posee buena recuperación de temperatura ambiente durante 24 horas (100%) para luego comenzar a contaminarse. Si el transporte se realiza entre 0 y 2°C, causa pérdida de microorganismos viables en 48 horas.

CAPITULO IV. DE LA TOMA DE MUESTRAS.

Toma y remisión de muestras para diagnóstico serológico.
Las muestras de sangre, para el diagnóstico de brucelosis, serán tomadas por el profesional veterinario acreditado por el SENASA para la tarea de declarar rodeos libres de brucelosis.

SUERO: es el líquido sobrenadante sobre el coágulo sanguíneo, después de retraído. Se trata de una parte del plasma pero sin fibrinógeno ni protombina (solamente residuos). Sin embargo contiene trombina. El contenido en minerales del suero está también más o menos disminuído con respecto al plasma.

En general por cada 10 ml. de sangre podemos obtener las siguientes cantidades de suero, dependiendo de la especie:

Caballo: 5-6 ml.

Bovino: 3-5 ml.

Cerdo: 5 ml.

Pequeños rumiantes: 3-5 ml.

Toma de las muestras :

El lugar de toma de la muestra de sangre depende de la especie que se trate, así:

Para **bovinos** el lugar de extracción de preferencia por su practicidad y rapidez de trabajo, especialmente cuando se trata de un gran número de animales, es en la base de la cola, donde se encuentra el plexo venoso caudal. La técnica es levantar la cola, la cola es sostenida por un ayudante (siempre que fuera posible), se busca el espacio entre dos vértebras caudales, cerca de la base de la cola y se introduce la aguja en el espacio intervertebral, sobre la línea media. La aguja está insertada en una jeringa de

5 ml., con el émbolo a la mitad del tubo de la jeringa, una vez que se ha llegado al plexo venoso la sangre fluirá dentro de la jeringa y se completa el volumen traccionando el émbolo hacia atrás. Con este volumen de sangre nos aseguramos tener un volumen de suero entre los 2 y 2.5 ml. Una vez que la sangre se encuentra en la jeringa se quita la aguja y lo más cuidadosamente posible se deposita por las paredes de un tubo. Los tubos que se utilicen pueden de vidrio o de plástico, pero se recomiendan los de vidrio ya que se favorece a la formación del coágulo. Es conveniente que la sangre se derrame por las paredes del tubo para evitar la hemólisis, la sangre hemolizada nos dificulta la lectura de las reacciones. Otro aspecto a tener en cuenta es que la sangre no forme espuma al ser depositada en el tubo, ya que esto también favorece la hemólisis.

Otra de las maneras de extraer sangre en la especie bovina es de la vena yugular, pero el inconveniente de esta técnica es que se necesita que el animal este inmovilizado con una mocheta y en un cepo, para poder llevarle la cabeza hacia un costado y poder tener bien presentada la tabla del cuello en su parte inferior donde vamos a encontrar la vena; haciendo presión en la base del cuello vamos a ver como se ingurgita la vena , la aguja se clava en la vena y se deja que se llene la jeringa de la misma manera que la anterior. La sangre es depositada en el tubo como se describió anteriormente. Esta técnica de la vena yugular es más dificultosa de realizar ya que hay que tomar con la mocheta a cada uno de los animales y es mucho el tiempo que se debe emplear, no es recomendable para un gran número de animales.

Para la especie **porcina** la técnica que se utiliza es la de extraer sangre de la vena de

la oreja ya que es la única vena visible en los porcinos (principalmente en cerdos adultos). La técnica que se utiliza es hacer presión sobre la base de la oreja para que se ingurgite la vena y se clava la aguja en forma paralela a la vena y se extrae la sangre como se describió para bovinos. La aguja se clava de arriba hacia abajo.

La sangre de los porcinos es la que más rápido tiende a hemolizarse, por lo tanto debe ser desuerada y refrigerada lo más rápido posible

Para **pequeños rumiantes** la vena que se utiliza es la yugular, el animal debe ser presentado por un ayudante y la persona que extraiga la sangre debe hacer presión sobre la base del cuello para ingurgitar la vena y así presentarla, se clava una aguja igual que lo descripto para bovinos.

Especie	Punto de extracción
Bovinos	Vena yugular, Vena coxígea
Cerdos adultos	Vena auricular, Vena yugular
Lechones y cerdos jóvenes	Vena cefálica del antebrazo, vena Femoral, golfo de las yugulares
Peq. Rumiantes	Vena yugular

La metodología descripta anteriormente se lleva a cabo cuando el personal de Laboratorio es el encargado de tomar las muestras. Sin embargo la mayoría de las muestras que arriban al laboratorio han sido extraídas por Veterinarios o Técnicos del ámbito privado. En este último caso las muestras pueden llegar de la siguiente forma:

- Suero
- Sangre entera

En el caso que el suero no esté límpido, se debe centrifugar para que los restos celulares se depositen en el fondo del tubo.

Tratamiento de las sangre entera:

Los tubos con sangre se colocan en el baño termostático a una temperatura de 40°C durante 4 hs.

Una vez obtenido el suero, trasvasarlo a otro tubo, previamente identificado.

Si el tiempo de permanencia en el baño termostático no provoca la exudación del suero, se debe proseguir de la siguiente manera:

Con un palillo desprender el coágulo de las paredes del tubo y desarmarlo.

Llevar el tubo a la centrífuga y centrifugar a 3500 RPM durante 5 minutos.

Acondicionamiento de las muestras.

Las muestras deben estar identificadas debidamente por el número de caravana, número marcado a fuego o número del tatuaje. Deben acompañarse con una planilla en los que consten:

- lugar de procedencia,
- propietario,
- categoría,
- edad aproximada,
- fecha de vacunación si se trata de bovinos,
- sexo,
- antecedentes si es que han tenido algún aborto o parto prematuro.

A continuación se presenta un ejemplo de planilla:

Establecimiento	
Propietario	Domicilio
Veterinario	
Fecha de extracción	
Especie	Fecha de vacunación
Sexo	Categoría
N° muestras	

N°carav	BPA	LT	2 ME	N°carav	BPA	LT	2 ME
1				25			
25				50			

Toma de muestras para análisis parasitológicos.

Coproparasitología.

Se pueden tomar muestras directamente del recto del animal, introduciendo la mano con una bolsa de polietileno en el recto, se rotula y se envía al laboratorio. Las bolsas deben estar identificadas con el número de caravana o tatuaje del animal correspondiente, se toma aproximadamente una muestra del tamaño de una nuez.

También puede tomarse las muestras de las "tortas"de materia fecal de los potreros, de esta manera no vamos a tener individualizadas las muestras sino que vamos a obtener una idea del estado de infectividad de los animales que se encuentran en ese potrero. Las bolsas deben estar individualizadas, sabiendo si son muestras individuales o pool de animales.

Ejemplo de planilla a utilizar en parasitología.

Establecimiento		Propietario
Fecha:		Domicilio
Muestras:	N°:	Examen solicitado
Resultados:		

Toma de muestras de las pastura y del suelo.

La forma que se recomienda para la toma de las muestras de la pastura es recorrer el potrero en forma de zigzag, se recogen 100 muestras de pasto que se arranca con la mano y al ras del suelo.

Si el camino que se recorre es en W se recogen entre 300 y 400 muestras. También se pueden hacer un muestreo franjas de 100 x 10, se toman cuatro muestras separadas entre sí por 10 cm, de un total de 50 zonas seleccionadas al azar.

Toma de muestras del suelo: se arrancan núcleos del suelo con un sacabocados de 7 cm de altura x 5 cm de diámetro. Se toman 60 muestras lo que representa una superficie de 0,12 mts2. Las muestras deben ser tomadas al azar.

Tratamiento de las muestras.

1) Las muestras de pasto pueden ser tratadas de forma individual o todas juntas. Se colocan en recipientes con agua, puede añadirse una pequeña cantidad de detergente común; se dejan de esta manera durante un día. Luego el material se tamiza a través de una malla de 200 a 250 um y 20 a 25 um examinándose el material retenido en los tamices.
2) Las muestras se lavan con agua durante 30 minutos, se vuelven a tamizar por los mismos tamices, para asegurar la recuperación total de las larvas. Las larvas que se recogen en los tamices se observan directamente, o se someten a un proceso de centrifugación en solución saturada de sulfato de magnesio (D: 1,28). Las estimaciones de las larvas en relación del peso seco de las pasturas se llevan a cabo secando el pasto lavado a 70°C hasta peso constante, y ajustando los

recuentos de las larvas con respecto a este peso.

Muestras de suelo: los núcleos de suelo se colocan en un recipiente con agua y se tamizan; luego se procede de la misma manera que con el pasto.

Toma de muestras de mucosa peneana y mucus vaginal para diagnóstico de las enfermedades venéreas.

Recomendaciones referentes al muestreo.

- Iniciarlos luego de 20 a 30 días de descanso sexual.
- Trabajar en condiciones de higiene mínima, cortando los pelos del prepucio y enjuagando el orificio prepucial para quitar la tierra.
- Descartar las muestras con materia fecal o heces.
- Dejar una semana de intervalo entre muestreos.
- Respetar las indicaciones para cada técnica de muestreo, descartando las innovaciones personales.
- Organizar el trabajo de manera tal que no pasen más de 6 horas desde que la muestra del primer toro es extraída hasta que es sembrada, siempre que no se usen medios de transporte especiales para colocar a la muestra.
- Si se emplea el método del raspador, se debe asegurar que éste sea correctamente esterilizado y enfriado. Cuando se muestren toros de razas índicas o sus cruzas hay que asegurarse de que todo el largo del raspador sea esterilizado.

Número de muestreos.

Para considerar negativo a un reproductor se deberán efectuar 6 muestreos negativos consecutivos con una semana de intervalo, como mínimo para el caso que se utilice la observación directa y 5 muestreos negativos consecutivos con una semana de

intervalo para el caso que se utilice el cultivo como método de diagnóstico.

En la práctica se utilizan 3 muestreos negativos para rodeos que son controlados todos los años y no presentan síntomas de la enfermedad. Los muestreos deben realizarse a la totalidad de los toros incluso a aquellos que aún no han entrado en servicio y ya tienen 2 años de edad (toros vírgenes).

Muestreo del macho.

Los métodos de recolección son los mismos que para la toma de muestras de material prepucial para determinar la presencia de *Campylobacter fetus*.

Se utilizan cuatro principales métodos o técnicas de muestreo en el toro. Previamente se realiza una higiene del orificio prepucial cortando los pelos adyacentes, para luego lavar con agua y jabón.

- Método del raspador
- Método de la pipeta
- Método de la ducha o lavado prepucial,
- Método del hisopo

Método del raspador.

Es un instrumento metálico de 70 cm de mango por 3 mm de diámetro; llevando en su extremo anterior la superficie de contacto, la cual consta de un cilindro de 13 cm de longitud por 8 mm de diámetro, estando éste ranurado con 31 surcos, que permite la acción del raspado. El raspador se introduce en el saco prepucial contactando con las mucosas peneana y prepucial. Se efectúan 15 a 20 movimientos de adelante hacia atrás, llegando hasta la parte más caudal del saco, y luego se introduce en el frasco

correspondiente al medio de cultivo para Trichomoniasis (medio Macrotric) y el contenido del otro raspador se coloca en el medio de transporte para vibriosis que contiene 8 ml de solución tamponada estéril; todo el procedimiento se repite con cada animal.

El método del raspador a resorte es el más práctico y el más difundido actualmente, se utilizan dos raspadores por toro: uno para vibriosis y el otro para Trichomoniasis; éstos se esterilizan por calor y se enjuagan con solución fisiológica.

Otras técnicas opcionales, menos difundidas.

Método de aspiración o pipeta de Bartlett.

Se utiliza un tubo estéril y flexible de 60 a 70 cm de largo con diámetros externos e internos de 10 a 8 mm respectivamente y acodado en uno de los extremos. Este es introducido dentro del saco prepucial y el otro extremo es conectado a un tubo flexible de 45 mm de largo. El material es desprendido por acción del raspado y succión del operador. El material es colectado y vertido en un tubo que contiene 8 ml de solución tamponada estéril.

Lavaje prepucial o método de la ducha.

Consiste en la introducción de 25 ml de solución tamponada estéril prepucial por intermedio de una pipeta de I.A. cortada y adosada a una goma flexible de 60 cm de largo. Luego se realizan masajes en la parte ventral, de craneal a caudal, realizando una cierta presión, por espacio de 1 minuto o bien 100 a 200 movimientos. El material obtenido por el lavaje se recoge en un frasco, el instrumental se esteriliza por ebullición durante 5 minutos.

Método de la torunda de gasa o del hisopo.

Mediante una torunda humedecida en solución fisiológica y un mango portatorunda, se realiza un frotado de la mucosa peneana; procediendo luego a colocar la torunda en un tubo que contiene una pequeña cantidad de solución fisiológica, para su posterior procedimiento. El hisopo se puede preparar con una almohadilla de gasa adosada a un mango de palo vigoroso de 1 cm de ancho y 14 de largo. Este hisopo es utilizado para muestreo en toros de I.A., aprovechando el salto para obtener la muestra por raspado del pene prolapsado. También se puede obtener semen para su posterior estudio.

El raspador se introduce en la cavidad prepucial, se efectúan entre 20 y 30 movimientos en sentido cráneo- caudal, luego de lo cual el resorte se enjuaga en un tubo que contiene el medio de transporte que se utilice.

Diagnóstico en la hembra.

Las variaciones poblacionales del parásito en vagina por el fenómeno de autoinmunidad le restan importancia práctica al diagnóstico, pero en caso de intentarse, se debería efectuar unos días antes del celo.

En caso de piómetras, el contenido purulento puede ser observado en forma directa o por cultivo.

Biopsia uterina.

Se utiliza una aguja de Nielssen y un tubo de acero inoxidable de 30 por 1,5 cm que es utilizado como espéculo, en cuyo extremo anterior se fija una gasa estéril provista de un fuerte hilo de 60 cm de longitud, capaz de retirarlas de su emplazamiento una vez finalizada la biopsia. Dicho "tampón"vaginal se utilizará para el test de

mucoaglutinación.

Se debe limpiar la vulva y el peroné, se fija el cuello del útero utilizando la misma técnica que para I.A. y por intermedio de la otra mano se procede a la introducción de todo el instrumental por la vulva, enfrentando el cérvix con el extremo del tubo provisto del tampón.

La aguja de Nielssen que se introduce conjuntamente e internamente al tubo de acero, desaloja primero la gasa para luego llegar dentro del cuello del útero. En ese instante se manipula su extremo libre para dejar al descubierto la porción encargada de recoger la muestra uterina, la que es obtenida luego de hacer rotar sobre sí misma a la aguja, que posteriormente es cerrada y retirada del animal. Luego de 15 a 20 minutos se retira el "tampón", el cual es resguardado en un frasco estéril, para su utilización en la prueba de mucoaglutinación. La aguja de Nielssen es utilizada para vaquillonas vírgenes (técnica de Adler) que consiste en juntar un pool de lavajes prepuciales del rodeo sospechoso e inocular 2 cc del mismo a una vaquillona con celo inducido. Luego de 40 días se comienza a muestrear cada 3 días sembrándose las muestras en agar-sangre con antibióticos, considerándose el diagnóstico negativo luego de 2 meses de muestreo.

Pipeta curva.

Es un tubo de vidrio de 50 cm de longitud y 1 cm de diámetro. Uno de los extremos presenta un codo pronunciado a unos 10 cm de la terminación, el cual es tamponado ligeramente con algodón. El otro extremo lleva un algodón apretado para servir de tope al moco. Las pipetas son envueltas en papel impermeable y se esterilizan mediante autoclave, antes de su utilización.

Al extremo recto de la pipeta se le acopla un tubo de goma de pared gruesa de 50 cm de longitud, se le quita el tapón de algodón al extremo acodado, para luego introducirlo a través de la vagina hasta llegar al cuello uterino. Se aspira por el extremo libre del tubo de goma y se hace rotar la pipeta o se le imprimen movimientos de avance y retroceso. La aspiración deberá continuar cuando la pipeta se retira de la vagina, luego se cierra el extremo con un tapón de goma estéril y se identifica la muestra.

Este método aporta mucus para cultivo o para realizar la prueba de mucoaglutinación, para este caso en vez de cerrarse con un tapón de goma se utiliza uno de algodón.

Pipetas de inseminación.

Se utilizan pipetas de I.A. y un tubo de vidrio de 28 cm de largo por 8 mm de espesor como espéculo. Estos últimos se autoclavan en los contenedores para pipetas.

Un bulbo plástico es adosado a uno de los extremos de la pipeta y ésta retirada del envase e insertada a través del espéculo. Luego de introducirla hasta el cérvix y aspirar el mucus, se procede a sellarla en el otro extremo mediante un tapón.

Se puede aislar el microrganismo de más del 95% de las muestras de mucus cervical, de vacas que estuviesen en los primeros cuatro meses postinfección. A medida que se establece el estado de resistencia en el útero, el número de C. fetus declina implicando una mayor dificultad para el aislamiento.

Diagnóstico a partir de fetos.

En general no es material fácil de obtener por ser pequeños y pasar desapercibidos.

Los flagelados se ponen de manifiesto por observación microscópica directa o por cultivo de los líquidos fetales, placenta, líquido de abomaso o hisopado de las fauces.

CAPITULO V. DE LAS TECNICAS DIAGNOSTICAS.

Desarrollo de las técnicas para diagnóstico de brucelosis.

Diagnóstico serológico.

Prueba de BPA

Esta prueba es de fácil ejecución pero está más condicionada a factores externos que las pruebas de aglutinación en tubo.

Material a utilizar:

Mezcladores

Gotero

Placa de vidrio

Aglutinoscopio

Pipeta de Bang

Reloj alarma

Antígeno para la pruebe de BPA.

Preparación del material antes de iniciar la prueba:

- Retirar el antígeno de la heladera, en el momento de realizar la prueba debe estar a temperatura ambiente.
- Lavar y secar perfectamente la placa y los mezcladores.
- La placa y los sueros deben estar a temperatura ambiente: 18°C-23°C.
- Agitar el antígeno suavemente, realizando movimientos circulares, para homogeneizarlo antes de utilizarlo.
- Homogeneizar los sueros invirtiendo los tubos.

Ejecución:

1. Colocar la placa sobre el aglutinoscopio.
2. Con la pipeta de Bang, pipetear el suero hasta el enrase 0.
3. Apoyar la pipeta sobre la placa, de manera tal que formen un ángulo de 45°.
4. Descargar la pipeta hasta el enrase 0,08, correspondiente a 0,08 ml de suero.
5. Con el gotero en posición perpendicular a la placa, colocar una gota de antígeno sobre el suero.
6. Homogeneizar, con los mezcladores, el antígeno y el suero con movimientos circulares, abarcando una superficie de 3 cm de diámetro.
7. Una vez homogeneizados, tomar 5 minutos de tiempo con el reloj alarma.
8. Tapar el aglutinoscopio.
9. A los 5 minutos, abrir el aglutinoscopio, tomar la placa con las manos por sus extremos y balancearla suavemente, haciéndola girar de derecha a izquierda. Realizar aproximadamente 10 movimientos.
10. Apoyar la placa nuevamente sobre el aglutinoscopio, taparla y tomar 3 minutos de tiempo.
11. A los 3 minutos destapar la caja, encender la luz del aglutinoscopio y efectuar la lectura realizando el mismo movimiento que durante la homogeneización.

Interpretación de los resultados :

Positivo: cuando se forman grumos .

Negativo : cuando la mezcla y el suero permanecen homogéneos y sin grumos.

Prueba del Rosa de Bengala o de la tarjeta.

Detecta IgG1 y al igual que otras pruebas en placa está condicionada a factores externos.

Material necesario:

Mezcladores

Gotero

Placa de vidrio

Pipeta automática, graduada en 0,03 ml

Tips

Reloj alarma

Antígeno para la prueba de Rosa de Bengala

Precauciones a tener en cuenta antes de realizar la prueba:

- Retirar el antígeno de la heladera, en el momento de realizar la prueba debe estar a temperatura ambiente.
- Lavar y secar perfectamente la placa y los mezcladores.
- La placa y los sueros deben estar a temperatura ambiente: 18°C-23°C.
- Agitar el antígeno suavemente, realizando movimientos circulares, para homogeneizarlo antes de utilizarlo.
- Homogeneizar los sueros invirtiendo los tubos.

Ejecución:

1. Colocar la placa de vidrio sobre la mesa.
2. Con la pipeta automática tomar el suero (0,03 ml).
3. Apoyar la pipeta sobre la placa de modo que formen un ángulo de 45°

4. Descargar la pipeta, el volumen correspondiente es de 0,03 ml de suero.
5. Con el gotero en posición perpendicular a la placa, colocar una gota de antígeno sobre el suero.
6. Homogeneizar, con los mezcladores, el antígeno y el suero realizando movimientos circulares.
7. Una vez homogeneizados, tomar 4 minutos de tiempo con el reloj alarma.
8. Balancear suavemente la placa, tomada por sus extremos, realizando movimientos circulares.
9. A los cuatro minutos, realizar la lectura sobre fondo blanco.

Interpretación :

Positivo: presencia de grumos

Negativo : ausencia de grumos.

Recordar: La lectura debe realizarse balanceando suavemente la placa de vidrio y sobre un fondo claro.

Prueba de aglutinación lenta en tubo (LT) o de Wright.

Es una prueba de referencia, se realiza sobre los sueros que resultaron positivos al BPA. Detecta Ig M e Ig G2.

Es una prueba cuantitativa. Está menos expuesta a errores de manipulación y a factores ambientales que las pruebas de aglutinación en placa.

Recordar: esta prueba debe realizarse en conjunto con la prueba de 2 mercaptoetanol (2 ME).

Material necesario:

Pipetas de Bang (una por cada suero)

Gradillas

Tubos de ensayo o de Khan, 4 por muestra de suero.

Pipetas de 10 ml

Solución fenolada al 0,5 %

Antígeno de Wright al 2,00 %

Estufa de cultivo

Precauciones a tener en cuenta antes de iniciar la prueba:

- Retirar las soluciones de antígeno, fenol y 2 ME de la heladera. En el momento de realizar la prueba deben estar a temperatura de laboratorio (20 - 22°C).
- Disponer en una gradilla 4 tubos para la prueba LT y 4 tubos para la prueba de 2 ME. La manera de disponer los tubos y su identificación es una práctica que cada técnico adopta para su mejor manejo.
- Homogeneizar los sueros invirtiendo los tubos.

Ejecución:

1. Tomar la pipeta de Bang con la mano derecha y con la mano izquierda el tubo de suero.
2. Pipetear suero hasta el enrase 0.
3. Volver a la gradilla correspondiente el tubo de suero.
4. Tomar cada uno de los tubos de la prueba LT y descargar las siguientes cantidades de suero, que se corresponden con los siguientes enrases de la pipeta de Bang:

Tubo	Volumen de suero	Enrase de la pipeta de Bang
Tubo 1	0,08 ml	De 0 a 0,08
Tubo 2	0,04 ml	De 0,08 a 0,12
Tubo 3	0,02 ml	De 0,12 a 0,14
Tubo 4	0,01 ml	De 0,14 a 0,15

5. Con una pipeta de 10 ml agregar 1,00 ml de solución fenolada al 0,5 % en cada uno de los tubos.
6. Llevar a un lugar al resguardo de la luz durante 60 minutos.
6. Con otra pipeta de 10 ml agregar 1,00 ml de antígeno de Wright al 2,00 % en cada uno de los tubos.
7. Agitar la gradilla por sus extremos para favorecer el contacto entre el suero y las soluciones agregadas.
9. Incubar por 48 horas a 37°C.

Lectura : se realiza contra un fondo oscuro y una luz que atraviesa los tubos. Las determinaciones se basan tanto en la claridad de las mezclas como en el grado de aglutinación del antígeno y en la firmeza de los grumos al agitar suavemente el tubo. El grado de aglutinación de los tubos puede clasificarse como completo (+), incompleto (I) o negativo (-) .

Aglutinación completa: cuando el líquido de la mezcla aparece claro y la agitación suave no rompe los grumos.

Aglutinación incompleta: la mezcla está parcialmente clara y una suave agitación rompe los grumos .

Aglutinación negativa: es cuando la mezcla es turbia (no es clara) y no hay grumos.

Prueba del 2 mercaptoetanol.

La prueba se basa en la propiedad de los compuestos químicos con grupos sulfidrilos, como el 2 mercaptoetanol, de inactivar las inmunoglobulinas Ig M.

Material necesario:

Pipetas de Bang (una por cada suero)

Gradillas

tubos de ensayo o de Khan

Pipetas de 10 ml

Solución de 2 mercaptoetanol 0,1 M.

Antígeno de Wright al 2%

Estufa de cultivo

Ejecución :

1. Tomar la pipeta de Bang con la mano derecha y con la mano izquierda el tubo de suero.
2. Pipetear suero hasta el enrase 0.
3. Volver a la gradilla correspondiente el tubo de suero.
4. Tomar cada uno de los tubos de la prueba LT y descargar las siguientes

cantidades de suero, que se corresponden con los siguientes enrases de la pipeta de Bang:

Tubo	Volumen de suero	Enrase de la pipeta de Bang
Tubo 1	0,08 ml	De 0 a 0,08
Tubo 2	0,04 ml	De 0,08 a 0,12
Tubo 3	0,02 ml	De 0,12 a 0,14
Tubo 4	0,01 ml	De 0,14 a 0,15

5. Con una pipeta de 10 ml agregar 1,00 ml de solución de 2 ME 0,1 M en cada uno de los tubos.
6. Llevar a un lugar al resguardo de la luz durante 60 minutos.
7. Con otra pipeta de 10 ml agregar 1,00 ml de antígeno de Wright al 2,00 % en cada uno de los tubos.
8. Agitar la gradilla por sus extremos para favorecer el contacto entre el suero y las soluciones agregadas.
9. Incubar en la estufa de cultivo a 37°C por 48 horas.

Lectura : se realiza contra un fondo oscuro y una luz que atraviesa los tubos. Las determinaciones se basan tanto en la claridad de las mezclas como en el grado de aglutinación del antígeno y en la firmeza de los grumos al agitar suavemente el tubo. El grado de aglutinación de los tubos puede clasificarse como completo (+), incompleto (I) o negativo (-) .

Aglutinación completa: cuando el líquido de la mezcla aparece claro y la agitación

suave no rompe los grumos.

Aglutinación incompleta: la mezcla está parcialmente clara y una suave agitación rompe los grumos .

Aglutinación negativa: es cuando la mezcla es turbia (no es clara) y no hay grumos.

Prueba del anillo en leche o PAL

Es una prueba de aglutinación que sirve para detectar los anticuerpos aglutinantes contra Brucella de la leche de los animales infectados. La leche debe ser cruda, entera, no descremada ya que la grasa es necesaria, para el desarrollo de la prueba

Es de alta sensibilidad, pudiendo detectar un animal positivo entre 20 o más; es práctica y económica. Se usa para la vigilancia epidemiológica de los tambos. Detecta la aparición de vacas reactoras de los establecimientos, no se la aconseja como prueba individual. Al detectarse un tambo positivo, debe utilizarse el diagnóstico individual y oficial, o sea, debe utilizarse el BPA.

Fundamento: la unión antígeno-anticuerpo forma un enrejado de aglutinación: enrejado de Marrack, los glóbulos de grasa, al ascender no pueden pasar por esta trama por lo tanto la levantan, acumulándose en la superficie del tubo, dando color al anillo de grasa.

Las muestras pueden provenir de los tarros o del tanque de leche, debe estar bien mezclada y se deben tomar 50 ,00 ml de leche o bien tomar muestras de 25 vacas en varios recipientes y entonces obtendremos información más certera (si tenemos identificados el número de las vacas a las cuales pertenece la leche de cada recipiente).

Material necesario:

Formol al 1% (1,00 ml de formol puro en100,00 ml de agua destilada)

Antígeno para PAL

Tubos de vidrio de 12 x 75 mm

Gotero calibrado (una gota = 0,03 ml)

Estufa de cultivo

Una vez que las muestras llegan al Laboratorio se procede de la siguiente manera:

- Agregar 1,00 ml de formol al 1% por cada 10,00 ml de leche.
- Refrigerar las muestras (4 a 6 ° C) durante 24 a 72 horas.

Precauciones antes de realizar la prueba:

- Retirar la leche y el antígeno de la heladera para que en el momento de la prueba se encuentren a temperatura ambiente.
- Mezclar cada muestra invirtiendo el recipiente varias veces.

Ejecución:

1. Tomar un tubo de vidrio de 12 x 75 mm por cada muestra
2. En cada tubo colocar 1,00 ml de leche, con una pipeta de 1 ml.
3. Agregar con el gotero calibrado, una gota de antígeno para PAL (equivale 0.03 ml).
4. Una vez colocado el antígeno mezclar bien la muestra, invirtiendo el tubo varias veces con el objetivo de que haya un buen contacto con el antígeno y la columna de leche.
5. Llevar a estufa de cultivo a 37 °C por 1 hora.

Interpretación de los resultados:

Negativo: Anillo de crema blanco y la columna de leche es azul.

Positivo +:Anillo de crema es color violeta y columna de leche conserva el mismo color .

Positivo + +: El anillo de la crema es de color violeta intenso y la columna de leche es de color violeta débil.

Positivo + + +: El anillo de crema es violeta intenso y la columna de leche es color totalmente blanca.

Un resultado positivo indica que existe por lo menos una vaca infectada en el grupo de animales a los que se ha sometido al test, ya que aparecen en la leche anticuerpos aglutinantes contra *Brucella*.

Recordar que cuando la mezcla proviene de mayor número de animales, debemos modificar el volumen de leche, manteniendo la misma cantidad de antígeno.

Número de animales	volumen de leche
Menos de 150	1,00 ml
Entre 151 y 450	2,00 ml
Entre 451 y 700	3,00 ml
más de 700	dividir los rodeos

Las técnicas serológicas que se describen en el presente manual son las que se desarrollan en el CREACyT por ser las autorizadas por el SENASA.

Todo el material de vidrio que se utiliza en las pruebas serológicas, debe lavarse inmediatamente de obtenidos los resultados. Esto se realiza lavando los tubos con

agua corriente y detergente, se secan en la estufa a 40°C y luego se esterilizan en estufa o autoclave.

Diagnóstico bacteriológico de la brucelosis.

La brucelosis se puede diagnosticar bacteriológicamente, aislando y caracterizando las brucelas de los animales o del hombre infectados.

Las muestras habitualmente utilizadas para estos aislamientos son: leche, semen, exudados genitales, contenido del cuajar en fetos abortados, placenta, líquido de punción articular y sangre tomada durante los accesos febriles, especialmente en el hombre, así como muestras ganglionares y de punción medular. Las muestras se remitirán refrigeradas, tomando todas las precauciones necesarias durante su obtención y manipulación para evitar la infección del operador. Son particularmente peligrosas las placentas, líquidos y fetos de abortos por su alto contenido en brucelas.

Métodos de microscopía.

La investigación de bacterias al microscopio óptico es rápida, sencilla y de bajo costo.

Limpieza de los portaobjetos y cubreobjetos.

Portaobjetos: se utilizan de la medida de 76 x 26 x 1,2 a 1,4 mm, de vidrio transparente.

Deben permanecer por lo menos 24 horas en ácido clorhídrico diluído o en una mezcla de 9 partes de alcohol 90° y 1 parte de ácido clorhídrico.

En el momento de su uso, lavarlos con agua corriente y secarlos con un paño limpio o con papel absorbente.

Un portaobjetos limpio debe ser "mojable", es decir, que una gota de agua debe poder extenderse completamente por encima de él.

Cubreobjetos: las dimensiones habituales son de 20 x 20 mm. pueden lavarse como los portaobjetos, simplemente con agua o alcohol. Secarlos con cuidado.

Preparación de los frotis:

- Realización de la extensión.

Producto líquido: depositar en el centro del portaobjetos una pequeña cantidad del producto a examinar.

Extender la gota con el ansa de platino, de modo que la extensión sea lo más fina y homogénea posible.

Si el producto es denso, puede diluirse con unas gotas de solución fisiológica estéril.

Cultivo en medio sólido: depositar en un portaobjetos una gota de agua.

Disociar en ella una pequeña cantidad de cultivo.

Extender para obtener un frotis fino y homogéneo.

Sangre: depositar sobre el primer tercio del portabjetos una pequeña gota de sangre.

Hacer contactar con la misma un portaobjetos de bordes esmerilados, inclinado a 45°.

La sangre alcanza por capilaridad todo el borde de contacto del porta esmerilado.

Llevar suavemente, este porta hacia la parte libre del primero. Esto debe hacerse en un solo movimiento, sin detenerse ni volver atrás.

Organos: seccionar un pequeño fragmento.

Sujetarlo con una pinza de mano izquierda o diente de ratón.

Secar el trozo seccionado con papel tipo tisu

A continuación se puede proceder de dos maneras:

-Realizar una extensión, apoyando el órgano sobre el porta y haciéndolo correr

suavemente.

-Realizar una serie de aposiciones, sin apoyar demasiado para obtener preparaciones finas.

- Secado.

Dejar secar por sí solo el frotis.

Se puede acelerar la desecación acercándolo ligeramente a la llama del mechero de Bunsen.

- Fijación.

Realizar una vez que el extendido está bien seco.

El objetivo del fijado es adherir el frotis al porta y fijar la morfología de las bacterias por coagulación rápida de las proteínas.

Por calor: sujetar el porta con una pinza.

Aplastar la llama del mechero 3 veces contra la parte inferior del portaobjetos.

Por alcohol en frío: cubrir la preparación con alcohol etílico absoluto o metílico.

Dejar actuar por 1 a 2 minutos.

Escurrir.

Dejar secar.

- Coloración:

Se realiza la coloración por el método de Gram- Kopeloff y Beerman..

Reactivos necesarios:

I- Violeta de genciana alcalina.

II- solución iodoiodurada.

III- solución de fucsina.

IV- acetona pura o una mezcla de alcohol acetona en partes iguales.

Técnica:

1. Con la mano izquierda sostener el preparado.
2. Con la mano derecha verter solución de violeta de genciana de manera tal que se cubra completamente el porta.
3. Dejar actuar por 5 minutos.
4. Volcar el colorante anterior.
5. Lavar el preparado con la solución iodoiodurada.
6. Dejar actuar por 2 minutos.
7. Decolorar rápidamente con acetona pura o con una mezcla de alcohol acetona en partes iguales.
8. Lavar con agua destilada.
9. Cubrir el preparado con la solución de fucsina durante 5 minutos.
10. Retirar el exceso de colorante con agua destilada.

El violeta de genciana forma con el yodo compuestos coloreados que son fijados fuertemente por ciertas sustancias y que el alcohol tarda en disociar. Estas sustancias, que son formadas por el cuerpo protoplásmico de algunos gérmenes, hacen que se fije fuertemente el violeta de genciana después de agregar el yodo y que al hacer actuar al alcohol a continuación éste no lo decolora; mientras que debido a su acción, los microbios cuyo protoplasma no se combina con el compuesto yodado del violeta de genciana, el colorante cede rápidamente y toman el color del colorante de contraste: la fucsina.

Esta tinción de Gram que se describe en este Manual es la que se utiliza en el Laboratorio. A continuación se presentan otras coloraciones opcionales, que también pueden ser utilizadas.

Tinción para Brucelas, según Köster:

Sobre una muestra secada al aire y fijada al calor se cubre con una mezcla de solución de 5 partes de solución 1 molar de hidróxido de potasio y 2 partes de solución saturada de safranina durante un minuto (la mezcla debe prepararse en el momento).

Se lava con agua.

Se decolora con ácido sulfúrico al 0,1% durante 15 segundos.

Se repite la decoloración. Se lava con agua.

Se colorea con azul de metileno al 1%(fenicado).

Las brucelas se verán de color rojo sobre fondo azul.

Coloración de Stamp o de Ziehl-Nielsen modificada.

El preparado fijado por calor se cubre durante 10 minutos con solución madre de fucsina de Ziehl diluida 1/10.

Se lava con agua.

Se decolora durante no más de 30 segundos con ácido acético al 0,5%.

Se lava con agua.

Se colorea con azul de metileno al 1% durante 20 segundos.

Las brucelas se observan de color rojo sobre fondo azul.

Coloración para brucelas según Hansen

Se colorea con azul de metileno de Löffler durante un minuto.

Se lava con agua corriente.

Se tiñe con una solución de safranina acuosa al 3%, durante 15 a 20 segundos.

Lavar y secar.

Las brucelas se tiñen de color azul sobre fondo rojo.

Cultivo

El cultivo de muestras se utilizará en casos que sea necesario demostrar en forma directa la presencia del agente.

Las muestras se siembran por duplicado sobre placas que contengan el medio agar para Brucella ya que permitan su desarrollo.

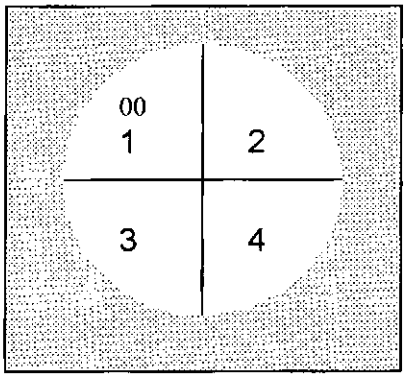
Otros medios que pueden utilizarse son los siguientes: agar triptosa-suero, agar tripticasa soya-suero, agar hígado, agar papa, agar dextrosa con suero, medio de Kuzdas y Morse.

Siembra de las placas

Técnica de siembra de placas por estrías.

1. La superficie del agar debe estar seca, lo que se consigue llevando la placa entreabierta a la estufa durante 15 a 30 minutos.
2. Disponer la placa sobre la mesa con la tapa hacia abajo.
3. Tomar la placa con la mano izquierda, manteniéndola invertida.
4. Con la mano derecha tomar el ansa.

5. Cargar el ansa con el material a sembrar.
6. Depositar el inóculo en 00.
7. Extender sobre una pequeña superficie.
8. Efectuar estrias muy próximas con el ansa de platino sobre los cuadrantes 1 y 2
9. Flamear y dejar enfriar el ansa.
10. Sembrar el cuadrante 3 a partir del 2.
11. Flamear y enfriar el ansa.
12. Sembrar el cuadrante 4 a partir del 3.



Incubación:

1. Una de las placas se incuba a 37°C en aerobiosis y la otra en atmósfera con 10% de dióxido de carbono(CO_2).
2. Para obtener una atmósfera de 10% de CO_2 se utiliza el método de la vela:
3. Llevar la placa sembrada, invertida, a un recipiente con tapa hermética
4. En el interior del recipiente colocar una vela encendida
5. Taparlo herméticamente.
6. La llama de la vela consumirá el oxígeno y generará dióxido de carbono hasta que éste llegue a una concentración del 10%, en este momento la vela se apagará, de esta manera se obtiene la atmósfera necesaria.
7. El recipiente se lleva a la estufa de cultivo para su incubación a 37°C.

Las colonias de Brucella tienen un diámetro de 2 a 7 mm, son esferoidales, de bordes lisos, de color ámbar pálido, húmedas, blanquecinas y traslúcidas, pueden variar algo por alteración del pH o de humedad. El aspecto microscópico de los frotis teñidos según Gram, muestra bacterias bastoniformes, cortas, Gram negativas.

Tipificación del Género *Brucella*:

Por ser una práctica que no se desarrolla en este momento en el Laboratorio no se la describe en detalle.

1. Investigación de la **producción de ácido sulfúrico (H2S)**, las muestras se siembran en medios que contengan tiosulfato de sodio. Se colocan tiras de papel embebidas en solución de subacetato de plomo en la parte superior del tubo. La producción de H2S se evidencia por el ennegrecimiento de las tiras al formarse sulfuro de plomo durante la incubación de los tubos. Los tubos se observan durante 4 días, cambiando las tiras diariamente. La *Brucella melitensis* habitualmente no lo produce en ese tiempo, la *B. abortus* lo hace hasta dos días y la *B. suis* durante cuatro días.
2. ***Prueba de los colorantes*** *se preparan placas de medio de cultivo conteniendo diluciones de 1/25000 la primera, 1/50000 la segunda y 1/100000 la tercera de fucsina básica y otras tres con las mismas cantidades conteniendo tionina. Se siembran con la muestra a probar en un trazo ancho con un hisopo y se incuban. La* Brucella abortus *crece en fucsina y no en tionina, la* B. suis *crece con tionina y no en fucsina y la* B. melitensis *crece con las dos.*
3. *Pueden efectuarse otras pruebas como la actividad ureásica, la lisis por fagos y la*

aglutinación por sueros monoespecíficos.

Diagnóstico de las parasitosis en los rumiantes.

Examen de las heces.

A. METODOS CUALITATIVOS.

- Sistemas de enriquecimiento.

Enriquecimiento por flotación.

Fundamento de la técnica: los huevos de los vermes suben a la superficie cuando se encuentran en un líquido de mayor peso específico, sobrenadando. Los huevos de parásitos tributarios de este método de análisis, dependen de la densidad de la solución empleada para la flotación.

Método de flotación según Fullerborn.

Material necesario:

Solución de cloruro de sodio (sal común) a saturación

Mortero

Colador de té

Gasa

Embudo

Tubo de vidrio

Cubreobjetos

Portaobjetos

Microscopio óptico

Técnica:

1. Colocar 3,00 g de materia fecal en un mortero.
2. Agregar 20,00 ml la solución de cloruro de sodio (sal común) a saturación (D: 1,20).
3. Homogeneizar la mezcla.
4. Filtrar la mezcla a través de un colador de té con gasa en su interior, el colador se apoya sobre un embudo.
5. El producto del colado se deposita sobre un tubo de vidrio; hay que tener la precaución de que la superficie del líquido permanezca levemente por encima del borde del tubo, sin que se derrame.
6. Apoyar un cubreobjetos sobre el borde del tubo.
7. Dejar reposar 20 minutos.
8. Retirar el cubreobjetos.
9. Colocarlo sobre un portaobjetos con la superficie que contactó con el líquido sobre la superficie del porta.
10. Observar al microscopio óptico con aumento fuerte seco.

Resultados:

Con este método se pueden determinar huevos de áscaris, estróngilos, estrongiloides, anoplocéfalos, oocistos y esporocistos de protozoos. Los huevos de oxiuris, trichuris y capillaria no son demostrables por este método.

Esta técnica es la que se utiliza en el CREACyT por su practicidad y sensibilidad y por el amplio espectro de huevos que son posibles de demostrar.

Método de flotación con cloruro de cinc y solución salina, con centrifugación posterior.

Material necesario:

Solución de flotación

Tubos de vidrio

Tubos de centrífuga

Embudo de decantación

Centrífuga

Asa de platino

Portaobjetos

Microscopio.

Técnica:

1. Colocar las heces en un tubo
2. Agregar la solución de flotación
3. Mezclar y agitar.
4. Separar las fases en un embudo de decantación
5. Llevar el sobrenadante a un tubo de centrífuga.
6. Centrifugar durante 3 minutos a 1500 - 2000 RPM.
7. Recoger una gota de la superficie del líquido con un asa de platino
8. Colocar la gota sobre un portaobjetos.
9. Llevarla el portaobjetos al microscopio.
10. Observar con objetivos de 40 y 100 X

Para observar con lente de inmersión (100 X) se debe colocar una gota de aceite de cedro.

Resultados: Se pueden observar huevos de céstodes y nematodes, estos tardan más en sobreflotar; también se pueden observar quistes de protozoos.

Estas técnicas de flotación son los métodos cualitativos que se utilizan en el

Laboratorio.

Técnica de recuento de huevos de Mc Master.

Cámara de Mc Master: la cámara de recuento consta de dos portaobjetos separados entre sí por 3 o 4 tiras estrechas de vidrio de 1,5 mm de grosor, de forma que quedan 2 o 3 espacios de 1,5 mm de profundidad entre los 2 porta.

En la superficie interna del porta se delimita un espacio de 1 cm2 para cada una de las cámaras construidas. De esta forma el volumen delimitado por cada área es de 0,15 ml.

Material necesario:

Mortero

Solución salina saturada

Pipeta

Cámara de Mc Master

Microscopio

Técnica:

1. Se pesan 2,00 g de materia fecal (MF)
2. Colocar la MF en un mortero
3. Agregar 30,00 ml de solución salina saturada
4. Mezclar.
5. Tomar una muestra con una pipeta
6. Llenar los espacios de la cámara de recuento.
7. Coloca la cámara en el microscopio
8. Observar a menor y mediano aumento (10 y 40 X).

Los huevos ascienden hasta la superficie interna del porta superior, por lo tanto quedan sobre la superficie dibujada.

El número de huevos presentes en cada una de las áreas dibujadas se multiplica por 200 y representa el contenido en 1,00 g de muestra.

Esta técnica nos permite estimar la cantidad de huevos con un error de 10 huevos por gramo.

Para mejorar la técnica se puede tamizar la mezcla para eliminar el material grosero. Como tamiz se puede utilizar una manga de café o una gasa colocada en un embudo.

Coprocultivo.

Debido a que no siempre se puede hacer un diagnóstico específico a partir de los huevos, a veces es necesario cultivar las larvas hasta que queden en estado libre.

Materiales:

Frasco de vidrio con tapa

Telgopor desgranado

Estufa de cultivo

Aguja o un pincel fino

Porta

Lupa o microscopio óptico

Técnica:

1. Disgregar las heces.
2. Colocarlas en un frasco de vidrio tapado.
3. Si las heces estuvieren muy secas se recomienda agregar algunas gotas de agua.

4. Agregar telgopor desgranado.
5. Incubar en la estufa a 26°C, aproximadamente durante una semana.
6. Las heces no deben estar ni demasiado húmedas ni demasiado secas.
7. Luego de la incubación,
8. Coloca el frasco bajo una luz difusa, provocándose la migración de las larvas por las paredes del frasco,
9. Recoger las larvas de las paredes del frasco con una aguja o un pincel fino, Colocarlas sobre un porta con una gota de agua
10. Observarlas bajo una lupa o microscopio óptico.
11. Es recomendable matar las larvas por calentamiento suave hasta que dejen de moverse, de forma que queden totalmente extendidas.

Las técnicas cualitativas de flotación, la técnica de Mc Master y el coprocultivo son los métodos diagnósticos que se utilizan en el Laboratorio por ser sencillas y rápidas.

Técnicas opcionales:

Método de sedimentación.(Modificación según Benedek).

Fundamento: las larvas y los huevos de los vermes se hunden en el agua, a causa de su mayor peso específico, hasta el fondo del reciente.

Con la adición de algunas gotas de detergente se acelera esta sedimentación.

Técnica:

Se mezclan bien, con agua 5,00 a 10,00 gramos de heces y a través de un tamiz plano (malla de 250 um), se vierten en un vaso de precipitado de 250 ml. El vaso se llena con agua a través del propio tamiz hasta una altura de 10 cm. Dejar sedimentar

durante unos 3 minutos. Decantar o absorber el sobrenadante hasta 1 o 2 cm del fondo. Lavar dos veces más con agua, dejando sedimentar 3 minutos después de cada lavado. Por último, añadir al sedimento unas gotas de solución de azul de metileno y traspasarlo a una placa de Petri. Examinar los restos a fin de elegir las formaciones filamentosas, que se examinan al microscopio con pequeño aumento o con una lupa de 10 x 3,5.

Resultado: Los huevos de fasciolas aparecen de color amarillo claro, o grisáceos.

Técnica de Dennis, Stone y Swanson.

Puede utilizarse como un método tanto cualitativo como cuantitativo.

Se colocan 2,00 gramos de materia fecal en 60,00 ml de la solución detergente, trasvasar a un frasco cilíndrico a través de un colador sostenido por un embudo. Esperar 5 a 10 minutos, hasta que sedimente; retirar el sobrenadante dejando 1 cm de sedimento. Agregar solución de detergente repitiendo el proceso de decantado y de eliminación del sobrenadante esté límpido. Poner luego el sedimento en una caja de Petri, agregar unas gotas de Lugol y examinar con lupa estereoscópica.

Solución de detergente:

Detergente concentrado: 5,00 ml

Agua: 995,00 ml

Alumbre férrico: 8 gotas.

Métodos de migración.

Fundamento: en caso de infestación por estróngilos pulmonares, no se eliminan los huevos (salvo en el cerdo), sino las larvas en fase 1. Estas larvas tienen un hidrotropismo positivo; emigran desde las heces fecales al agua del entorno.

Técnica: las muestras de las heces se coloca en una placa de Petri, que se llena de agua y mantiene en reposo al menos 5 horas.

Entonces se retiran las heces y se examina con una lupa el resto de contenido acuoso de la placa, para descubrir las larvas de estróngilos emigradas.

Método de migración según Baermann-Wetzel con embudo separador.

Fundamento: Las larvas incapaces de nadar se hunden en el agua al abandonar las heces.

Técnica: una porción de heces del tamaño de una nuez, se coloca en un pequeño colador de té o en una gasa.

El colador o la gasa se depositan en el borde de un embudo, colgadas en su centro, mientras el tubo permanece cerrado con una goma y una pinza de presión. Se llena de agua el embudo, procurando que quede sumergida al menos la mitad de la muestra de heces. Se deja reposar varias horas, lo mejor es una noche entera.

Después se abre con cuidado la pinza de presión del fondo del tubo y se recogen las primeras gotas en una placa de Petri, o directamente sobre un portaobjetos.

Observar al microscopio con pequeño y mediano aumento.

Resultados:

Las larvas de Dictyocaulus viviparus se distinguen por una clara granulada en su región intestinal, por un terminal caudal afilado y una morfología esofágica filiforme.

Los demás nematodes son menos diferenciables.

Método cuantitativo.

Método de dilución de Stoll.

Utiliza 3,00 gramos de heces pesadas en un tubo de ensayo graduado de 45 ml el

tubo se llena hasta la señal de 45,00 ml con una solución de soda cáustica decimonormal, agregándole 10 a 12 bolas de vidrio. El tubo se tapa con un tapón de goma y se agita hasta obtener una suspensión homogénea de las heces. Después de agitar, se pipetean 0,15 ml de la suspensión y se colocan en un portaobjetos.

Se cuenta el número total de huevos presentes en los 0,15 ml y se multiplica por 100; el número que resulta corresponde a la cantidad de huevos presentes en 1 gramo de materia fecal.

Es conveniente que los materiales groseros que se encuentran en la bosta de los animales sean tamizados.

Para el trabajo de campo, se debe utilizar un matraz graduado a 56 y 60 ml. Se llena el frasco con solución decimonormal de soda cáustica hasta 56,00 ml, añadiéndose heces hasta que el nivel del líquido alcance los 60 ml. Se pipetean los 0,15 ml y se precede como se explicó anteriormente. Este método es fiable para el recuento de huevos tanto de trematodes como de nematodes.

Técnicas opcionales para recuento de huevos de trematodes.

Los huevos de trematodes son, frecuentemente más pesados que lo de otros parásitos, por lo que los métodos de flotación no suelen detectarlos, a excepción del sulfato de cinc. La técnica de Stoll sirve cuando hay un número elevado de huevos, pero frecuentemente es importante detectar infestaciones cuando hay pocos huevos en las heces, por ejemplo cuando se han administrado antiparasitarios.

Para el recuento de huevos de Fasciola hepática se cuenta con los siguientes métodos:

- Para heces de oveja.

Pesar 10,00 g de materia fecal y colocarlas en un Erlenmeyer calibrado hasta 300 ml, llenarlo parcialmente con solución de hidróxido de sodio 0,4 N. Se tapa el Erlenmeyer y se deja reposar durante una noche. A la mañana siguiente se agita fuertemente para separar las heces y se llena hasta 300 ml con la misma solución, agitando de nuevo. Se transfieren 7,5 ml de esta mezcla a un tubo de centrífuga de 15 ml y se centrifuga. Se elimina el sobrenadante, se vuelve a repetir el proceso hasta que el líquido sobrenadante salga claro. El sedimento final se pasa por un tamiz de malla 80, y se recoge en una cámara de recuento, que consiste en una placa de Petri de 70 mm en al que se marcan líneas paralelas separadas entre sí por una distancia de 3 mm. se coloca en un microscopio y se cuentan los huevos y se realizan los siguientes cálculos:

7,5 ml de muestra corresponden a 0,25 gr de heces, por lo tanto los huevos encontrados se multiplican por 4 para obtener la cantidad de huevos en un gramo de materia fecal.

- Para ganado vacuno.

Se utiliza un método semejante pariendo de 30,00 g de heces y utilizando 5,00 ml de muestra para centrifugar. Estos 5,00 ml corresponden a 0,5 g de materia fecal, por lo tanto el número de huevos recontados se debe multiplicar por 2 para obtener el número de huevos por gramo de materia fecal.

Como orientación se puede tener en cuenta los siguientes parámetros, considerando los signos clínicos:

1) Nematodes: en corderos, depende mucho del parásito de que se trate, pero de 2000 a 6000 hpg indican una infestación seria, recomendándose el tratamiento

cuando aparecen 100 hpg o más. En el ganado vacuno, la presencia de 300 a 600 hpg indica la necesidad de tratamiento.

2) Trematodes: la presencia de 100 a 200 huevos de Fasciola hepática por gramo en heces de bovinos, o 300 a 600 hpg en la oveja, indican una infestación suficiente para ser patógena.

Recuento de gusanos maduros e inmaduros.

Para este método de diagnóstico de las parasitosis del rodeo puede utilizarse un animal muerto o uno que sea representativo de los animales enfermos y que será sacrificado.

Se realiza una necropsia según la técnica correspondiente a la especie de que se trate. Cuando se llega al aparato digestivo se liga el esófago a la altura del orificio ruminal y el recto a la altura de la ampolla rectal. También puede ligarse en varias porciones, para trabajar con más comodidad sobre todo si se trata de bovinos.

El contenido se coloca en baldes y se pasa por una serie de tamices, para eliminar los residuos groseros. Los gusanos se recogen por lavado de los tamices y se procede a su recuento e identificación. Se puede realizar el recuento total o a partir de alícuotas del material debidamente homogeneizado.

La mucosa del tracto digestivo se puede someter a digestión con pepsina ácida a 37°C. La pepsina se prepara de la siguiente manera:

pepsina: 10,00 g; ácido clorhídrico: 30,00 ml; agua: 1000,00 ml.

Esta solución se coloca con trozos de mucosa a 37°C durante varias horas. Se tamiza por una malla de 200 aberturas por pulgada lineal, lo cual retiene los gusanos inmaduros. Estos se conservan en formol al 5% en solución salina. Para el examen de

los gusanos es conveniente colocarles una gota de solución de Lugol, ya que facilita su reconocimiento.

Otra técnica para obtener los parásitos inmaduros de la mucosa, se utiliza una solución salina normal. El abomaso abierto y lavado se coloca en un recipiente de plástico de 10 litros, se cubre con solución salina normal a 40°C y se mantiene a esta temperatura por 4 o 5 horas. Se repite el procedimiento y luego el contenido de los recipientes se tamiza por una malla de 30,00 um, recogiéndose el residuo para proceder a su examen.

Estimación de las larvas infestantes en el pasto y en el suelo.

Toma de las muestras:

La forma que se recomienda para la toma de las muestras de la pastura es recorrer el potrero en forma de zigzag, se recogen 100 muestras de pasto que se arranca con la mano y al ras del suelo.

Si el camino que se recorre es en W se recogen entre 300 y 400 muestras. También se pueden hacer un muestreo franjas de 100 x 10, se toman cuatro muestras separadas entre sí por 10 cm, de un total de 50 zonas seleccionadas al azar.

Toma de muestras del suelo: se arrancan núcleos del suelo con un sacabocados de 7 cm de altura x 5 cm de diámetro. Se toman 60 muestras lo que representa una superficie de 0,12 m^2. Las muestras deben ser tomadas al azar.

Tratamiento de las muestras.

1) Las muestras de pasto pueden ser tratadas de forma individual o todas juntas. Se colocan en recipientes con agua, puede añadirse una pequeña cantidad de detergente común; se dejan de esta manera durante un día. Luego el material se

tamiza a través de una malla de 200 a 250 um y 20 a 25 um examinándose el material retenido en los tamices.

2) Las muestras se lavan con agua durante 30 minutos, se vuelven a tamizar por los mismos tamices, para asegurar la recuperación total de las larvas. Las larvas que se recogen en los tamices se observan directamente, o se someten a un proceso de centrifugación en solución saturada de sulfato de magnesio (D: 1,28). Las estimaciones de las larvas en relación del peso seco de las pasturas se llevan a cabo secando el pasto lavado a 70'°C hasta peso constante, y ajustando los recuentos de las larvas con respecto a este peso.

Muestras de suelo: los núcleos de suelo se colocan en un recipiente con agua y se tamizan; luego se procede de la misma manera que con el pasto.

Diagnóstico de campilobacteriosis por Inmunofluorescencia.

Preparación del Conjugado.

Inóculo.

Inmunizar los conejos, la cepa *C. fetus venerealis* utilizada debería ser aislada de un aborto bovino.

Proceder a la siembra en frascos de Roux en un medio que contiene: 28 gr de caldo brucela, 2,00 g de agar, 12,5 mg de glutation y 37,5 mg de thioglicolato de Na en 1 litro de agua destilada. Los frascos se incuban a 37 °C en una atmósfera de aproximadamente 12% de oxígeno, 83% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono. Luego de tres días se repica a placas de agar-brucela y se revisan para ver crecimiento. Las células son colectadas en solución salina fisiológica, que contiene

0,3% de formalina.

Filtrar la suspensión a través de lana de vidrio, luego de examinar que todas las placas produzcan tipos de colonias similares.

Lavar el filtrado 4 veces utilizando solución salina formolada, procediendo de la siguiente manera:

- Centrifugar a 1000 RPM por 5 minutos, descartándose el sedimento.
- Resuspender en solución salina formolada y centrifugar a 3500 RPM por 30 minutos, descartar el sobrenadante.
- Repetir el procedimiento anterior en dos oportunidades más.

A continuación se citan dos técnicas de dilución e inoculación:

Suspensiones celulares son preparadas para inyección endovenosa, por ajuste de la concentración a una densidad óptica de 0,37 a 525 um en un Espectronic 20. Una suspensión de cinco veces la concentración anterior, se emulsiona con un volumen igual al coadyuvante de Freund completo.

Se inmunizan conejos de aproximadamente 3,5 Kg mediante inoculación de 0,4 ml de emulsión, con coadyuvante, por vía intramuscular en cada uno de los muslos, seguido a los treinta días de una inyección endovenosa de 2,00 ml de la suspensión celular; o bien los conejos reciben inoculaciones endovenosas de 0,5; 1; 1,5 y 2,00 ml de la suspensión con tres días de intervalo, a las tres semanas se les hace una descarga endovenosa de 2,00 ml.

Todos los conejos son sangrados 10 días posteriores a su última inoculación. Se prepara el suero y se le adiciona merthiolate a una concentración final de 1:5000. Posteriormente se procede a la titulación de los sueros mediante el test de

aglutinación, siendo el título óptimo 1:10000 positivo o más; en caso contrario se procede a reinocular como se detalla en el procedimiento *17-1-1-2.*

Se diluye el sedimento en solución salina formolada hasta obtener una concentración de 1500 millones(escala 5 de Mc Farland).

Se procede a hiperinmunizar a los conejos por vía endovenosa de la siguiente manera:

DIA	DOSIS (cc)
1	0,5
3	0,5
7	1,00
10-11	1,00
14	1,5
17-18	1,5
21	2,00
24-25	2,00

Luego de 10 a 14 días posteriores a la última inoculación, se procede a extraer sangre para realizar las pruebas de aglutinación. El título apropiado deberá ser de por lo menos 1/10000 en el 50% de las aglutinaciones; de no ser así, reinocular 2 cc, para luego esperar 10-14 días y proceder a otra titulación.

Preparación del antisuero marcado.

1. Separar la fracción globulínica del suero inmune por precipitación con un volumen igual de una solución saturada de sulfato de amonio. Es conveniente añadir dicha

solución sobre el suero en 2 o 3 minutos con agitación constante por espacio de 1 hora. Centrifugar a 5000 RPM por 30 minutos, desechar el sobrenadante y suspender el precipitado en agua destilada, en un volumen a la mitad inicial.

2. Reprecipitar con sulfato y resuspender al igual que en la precipitación anterior.
3. Se coloca el precipitado en un saco de diálisis y se enfrenta con una solución salina tamponada hasta producir una reacción negativa de sulfatos en el líquido de diálisis, utilizando una solución de cloruro de bario al 5% como indicador. este análisis se realiza a 4°C con agitación constante, recambiándose la solución salina cada 4 horas.
4. Se valoran proteínas totales según el método de Biuret-Khjieldald espectrofotómetro.
5. Con el valor anterior , se calcula la cantidad total de isotiocianato de fluoresceína a utilizar, teniendo en cuenta una relación de 0,025 mg por mg de proteína
6. Para la marcación se diluye la solución protéica en solución salina tamponada hasta una concentración de 200,00 a 30,00 mg/ml a pH 9 con buffer carboinado-bicarbonado 0,5 M.
7. Llevar las globulinas a 4°C con agitación constante, añadiéndose la fluoresceína en cantidades pequeñas previa disolución de las fracciones anteriores. Se deja de esta manera durante 14 horas.
8. El conjugado se pasa a través de una columna conteniendo Sephadex G-25 de grado fino para promover la fluoresceína no conjugada siguiendo el procedimiento de Peters.

El conjugado es fraccionado mediante un Sephadex G 200, siguiendo el

procedimiento de Mc Devit.

La fracción que resulta de la dilución con buffer fosfatado 0,05 M pH 6,3 es la utilizada. La molaridad de la fracción es reducida por el pasaje de la solución a través de Sephadex G 25 de grado medio, el cual ha sido equilibrado con buffer fosfatado 0,005 M pH 7,9.

El conjugado se liofiliza y se reconstituye con agua destilada aprox. a 2/3 del volumen inicial de suero y luego dializado en solución fosfato salina bufferada (0,01 M fosfato pH 7,5) por 48 horas. Se adiciona merthiolate a una concentración final de 1:10000 y luego se almacena a -20°C en cantidades de 1 ml. El conjugado se titula para determinar la intensidad de tinción frente a cepas patrones. De acuerdo a ello el conjugado se diluye generalmente a 1/4 a 1/8 en solución tamponada.

Técnica de anticuerpos fluorescentes.

Esta técnica permite el diagnóstico a partir del líquido de abomaso de los fetos abortados, mucus vaginal, muestras prepuciales y semen en el caso de utilizar mucus vaginal se recomienda su filtración a través de una membrana de acetato de celulosa de 5u para evitar fluorescencia inespecífica.

Cuando se obtienen muestras prepuciales se centrifugan a 1200 RPM por 5 minutos, se toman 2,00 ml del líquido sobrenadante y se le agrega solución formolada al 0,25%. Luego se realizan los siguientes pasos:

- Centrifugar a 2700 RPM por 1 hora.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el depósito en 0,2 ml de agua destilada.
- Realizar el extendido de 0,03 ml sobre portaobjetos perfectamente limpios y marcados en círculos de 1 ½ cm.

- Secar al aire.
- Fijar en alcohol etílico absoluto por 15 minutos.
- Secar.
- Poner 0,05 ml del conjugado sobre el extendido.
- Incubar a 37°C durante 30 minutos en atmósfera húmeda.
- El extendido es lavado mediante frecuentes cambios de solución salina fosfatada bufferada por 20 minutos, cambiando dos veces la solución durante ese lapso.
- Secar.
- Aplicar un cubreobjeto utilizando glicerol fosfatado bufferado como montaje de pH 8,5.
- Se utilizan controles negativos y positivos, siendo cada preparado examinado bajo microscopio de luz ultravioleta utilizando objetivos de 40 X de inmersión; condensador de inmersión de fondo oscuro, una lámpara HB200 de luz ultravioleta, filtros primarios BG-12 y secundarios O-G1.

Cada preparado se observa durante 20 minutos o hasta encontrar un microrganismo con la morfología del *Campylobacter* y que fluoresca.

Ventajas:

- Sensibilidad de la técnica.
- No es necesario un tiempo mínimo de transporte para la muestra.
- La presencia de contaminantes no representa un problema.
- Rapidez diagnóstica, ya que puede realizarse en horas, con el consiguiente ahorro de material.

- Detecta concentraciones tan bajas de microrganismos como 50 a 100 por ml de muestra.

Desventajas:

- Requiere personal entrenado.
- No diferencia tipos de *Campylobacter*.
- En la hembra la proximidad anatómica de vulva y recto, puede hacer que se deposite *C. fetus intestinalis*, aunque en la vagina las condiciones son menos propicias que en el prepucio.

Esta técnica de inmunofluorescencia directa es la utilizada en el CREACyT.

A continuación se presentan, sin detalle, otras técnicas de diagnóstico que pueden emplearse para el diagnóstico de Campilobacteriosis.

Prueba de mucoaglutinación.

La prueba de aglutinación en mucus vaginal, comúnmente utilizada, no es particularmente sensible pero puede tenerse en cuenta como una prueba de una prueba para utilizar en el rodeo. La mayor dificultad que presenta es que las aglutininas son demostrables en el 50 % de las hembras afectadas. Estas aparecen en el mucus vaginal entre los 30 y 70 días postinfección, pudiéndose extender hasta los 3 o 4 meses. Los falsos negativos aparecen en reactores durante el estro; mientras que la sangre en el mucus, al igual que las lesiones inflamatorias menores en la región posterior del tracto reproductor, pueden dar falsos positivos en no reactantes.

El "tampón vaginal" una vez que permaneció dentro de ella por 20 minutos como mínimo es retirado e introducido en frascos de 40 ml y enviado refrigerado al laboratorio (sin congelar), lo más rápido posible. Una vez en el laboratorio se toma el peso del mucus por diferencia y se agrega una solución salina fisiológica al 0,3%,para extraer los anticuerpos locales y se realiza una dilución inicial de 1:12 1/2.

Esta preparación se lleva a 4°C por 12 horas. Luego se procede a la extracción del extracto salino utilizando dos pares de fórceps para comprimir el "tampón"o mediante presión con una pipeta. El extracto obtenido puede ser almacenado en el refrigerador por 1 año.

La mezcla mucus-solución, se diluye de 1:10 a 1:320 para luego adicionarle cantidades iguales de antígeno. Las muestras son incubadas a 37°C por 48 horas y a 50°C por 16 horas. Esta prueba, en general, aparece positiva a los 60 días postinfección y permanece en dicha condición hasta después de 7 meses (promedio).

Otras pruebas inmunológicas.

Se han desarrollado pruebas de hemoaglutinación para demostrar Ac. contra *C. fetus* en mucus vaginal.

Una de ellas utiliza eritrocitos de ovino sensibilizados con una fracción termoestable de *C. fetus venerealis* como Ag. Tiene la misma sensibilidad y performance que la prueba de mucoaglutinación.

La otra prueba utiliza Ac-tánico para tratar eritrocitos sensibilizados de oveja con una fracción soluble de *C. fetus venerealis* como Ag. Esta prueba es más sensible que la de mucoaglutinación y permite un diagnóstico precoz de los Ac., con una gran frecuencia luego de la infección inicial.

Metodología de cultivo.

Métodos de Agar-Sangre con Antibióticos.

Estos medios son utilizados para el aislamiento primario de *C. fetus*, cuando las muestras llegan al laboratorio, cuando las muestras llegan al laboratorio dentro de las 6 a 8 horas posteriores a su recolección o luego de ser sembradas en los medios de transporte.

Consiste en un agar-sangre de bovino, con 105 de sangre defibrinada en un agar nutritivo. Este último consiste en 1% de Bacto-peptona, 0,5% de extracto de carne y 0,5% de agar. Este medio base con algunas variantes, recibe ciertas cantidades de antibióticos que varían según los distintos autores.

Otros autores utilizan como base caldo Brucella, Thiol/agar, Agar-sangre cisteína cerebro-corazón, Agar-infusión cerebro-corazón, Medio de Dennis y Jones modificado, Agar-brucella, Agar-cisteína-corazón.

En estos medios se procede a sembrar 0,1 ml del líquido sobrenadante centrifugado a 1200 RPM por 5 minutos, en caso del contenido prepucial y en caso de los medios de transporte, el hisopado. También utilizados para líquidos o descargas genitales de las hembras y de fetos.

Las placas se incuban en medios de microaerobiosis en jarras de 37°C durante 7 días, procediéndose a la observación al tercer y séptimo día. Se utiliza una mezcla de 95% de Nitrógeno y 5% de Oxígeno.

El número de contaminantes está disminuído notablemente. Pueden aparecer *Proteus* y *Pseudomonas* como contaminantes, el primero puede ser eliminado adicionando agar al 8% para impedir la difusión.

Las muestras con orina podrían dar inmunofluorescencia positiva y cultivos negativos; pero en forma experimental y práctica, ha sido determinado que la viabilidad del *C. fetus venerealis* no es influenciado por el pH de la orina.

Filtración por Millipore.

Un ml de líquido se filtra a través de un prefiltro Millipore de 13 o 25 mm de diámetro Ap. 250-1300 y un filtro Millipore de 0,65 u DAWP o 1300 de 13 o 25 mm de diámetro. Para fijación de dichos elementos se utiliza un soporte plástico o metálico con el diámetro apropiado.

Luego de realizar la filtración se procede a la siembra de 0,1 ml en los medios de agar-sangre con antibióticos.

la ventaja de este método de filtración es que permite la utilización de materiales muy contaminados, peor tiene el inconveniente que reduce el número de *C. fetus* y puede negativizar a toros con una baja carga de *C. fetus*.

Colonias.

Después de la incubación, las placas de cultivo se examinan mediante una lupa estereoscópica para evidenciar los distintos tipos de colonias. Las que podrían considerarse como tipos básicos de los C. fetus, miden entre 1-3 mm de diámetro, son brillantes, de color gris pálido, semitraslúcidas, planas o cónicas, siendo algunas colonias rugosas más opacas que las lisas. a veces sobre una misma placa se dan colonias pequeñas y grandes. A medida que el cultivo envejece, las colonias se opacan y forman filamentos radiados hacia la periferia.

El *C. fetus subesp. intestinalis* produce colonias lisas de 1mm de diámetro, de color crema; las rugosas son pequeñas, redondas, finamente granuladas, opacas y de color

blanco crema.

Las colonias lisas incubadas 6-8 días, se transforman en mucoides. En aislamientos primarios producen colonias bajas, planas, traslúcidas, de bordes irregulares y no hemolíticas.

El *C. spotorum subesp. bubulus* es reconocido por la coloración verdosa de sus colonias (2-4 mm de diámetro) con una zona del mismo color en el centro rodeada de una alfa hemólisis, visible al examen visual de las placas al tercer día de incubación. Microscópicamente posee colonias convexas, verdes, con una pátina granulosa opaca, de borde irregular y consistencia butirosa.

En subcultivos el *Campylobacter* no forma colonias individuales verdaderas, ni grandes ni chicas, presentando en ocasiones el aspecto de varias colonias que se hubiesen fundido entre sí formando una masa mucoide.

Tipificación del género *Campylobacter.*

Se toma la colonia sospechosa y se visualiza por microscopio de contraste de fase, para observar movilidad y morfología, confirmándose esta última por tinción.

Para realizar las pruebas bioquímicas, se toman dos colonias de una placa positiva a Campylobacter para su tipificación. Se siembra en thiol semisólido o caldo de Brucella Albimi por 3 días a 37° C en microaerofilia y posteriormente se toman 0,02 ml del inóculo para realizar las distintas pruebas.

Las pruebas de la catalasa y SH2 se realizan en medios descriptos por Dennis y Jones y modificado por Dufty. Las pruebas de tolerancia a la glicina al 1% en caldo Brucella o bien se realizan todas las pruebas en agar Brucela, thiol o thioglicolato semisólido o en caldo Albimi. Todas las pruebas se incuban a 37°C en microaerofilia.

Si se trabajan con medios que poseen más de 0,02% de agar, en tubos tapa a rosca, no es necesario la utilización de una atmósfera microarófila. Las pruebas se leen luego de 5 días de incubación.

Prueba de la catalasa.

Se determina por la adición de iguales volúmenes de agua oxigenada (3 volúmenes) y un cultivo de 5 días de incubación en un tubo de hemólisis al cual se le sustituye el tapón de algodón por un tapón especial provisto de un tubo capilar de 17 mm de diámetro. Se invierte el contenido y mediante un lápiz graso se marca el nivel. Posteriormente se agita el tubo invirtiéndolo en reiteradas oportunidades y se lo deja en posición invertida, en una cesta de alambre sobre un sumidero, durante 20 minutos. Luego se mide en mm el volumen del líquido desplazado por el gas y se anota este dato como el número de catalasa.

Los cultivos que desalojan más de 5 mm, se consideran catalasa positivos.

Producción de SH2.

Al medio de Dennis y Jones modificado, se le agrega 0,03% de hidrocloruro de cisteína esterilizada por filtro de Seitz. Se le agrega el inóculo en cantidad e 0,02 ml y posteriormente una tira de papel de filtro, sumergida en solución saturada de acetato de plomo, se deposita a una altura de 1 cm del medio.

Prueba de tolerancia a la glicina al 1% y ClNa 3,5%.

Ambas pruebas se realizan en los medios recomendados anteriormente, más el agregado de 1% de glicina o 3,5% de ClNa en uno u otro. Se incuban a 37°C por 5 días y se visualiza una muestra del medio en un microscopio de contraste de fase para evaluar crecimiento.

Prueba de tolerancia a la glucosa al 8%, formol al 1%y 1,5% y bilis al 2%.

Igual a las anteriores pero cambiando el sustrato.

Prueba de tolerancia al selenito de Na al 0,1%.

Se inocula el cultivo en la superficie el medio agar Albimi conteniendo 0,1% de selenito de sodio. El crecimiento bacteriano y la reducción del selenito son fácilmente detectados por la aparición en el medio de colonias opacas-rojas-anaranjadas.

Características bioquímicas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
C. fetus veneralis	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C.fetus intermedius	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
C.fetus intestinalis	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
C.fetus jejuni	+	-	+	NT	NT	+	+	NT	NT	-	NT	NT	NT	-
C.sporotum sporotum	-	-	+	NT	NT	+	+	NT	NT	+	NT	NT	NT	+
C. sporotum bubulus	-	+	+	+	+	+++	-	+	+	+	-	+	+	v
C.fecalis	+	v	+	NT	NT	+	V	NT	NT	+	NT	NT	NT	-

Referencias:1-catalasa;2-ClNa 3,5%;3-Glicina 1%; 4-TSI; 5-SH2 Ac Pb 24 hrs. 6-SH2 Ac Pb 5 d; 7- bilis;8- selenito de Na 0,1%;9-glucosa 8% 10-reduce nitratos;11-aerobio;12-formatode Na 1%;13-formato de Na 1,5%; 14-25°. NT: no testeable. V: variable.

El género Campylobacter no requiere suero, ni hidrolizan urea ni gelatina. Rojo de Metilo y Voges Proskauer negativos. No poseen actividad lipasa/oxidasa positivos. No producen pigmentos. Son microaerófilos o anaerobios.

Diagnóstico de Trichomoniasis

Los antecedentes reproductivos del rodeo son de gran valor para sospechar de la

enfermedad, especialmente si los porcentajes de preñez son bajos, con servicio estacionado (3 meses) y ya se han descartado otras enfermedades. Las vaquillonas y vacas que nunca han tenido contacto con el agente son altamente susceptibles. La repetición de celos y su consecuencia, la falta de preñez al final del servicio (que lleva al productor a prolongar el período de servicio) junto a la presencia de abortos y piómetras o las diferencias entre porcentaje de preñez y parición hacen sospechar la presencia de la enfermedad en el rodeo. En cambio si la enfermedad se hace crónica, las vaquillonas de reemplazo serán las únicas afectadas y contrariamente a lo que debería ocurrir si no estuviera presente la enfermedad, los porcentajes de preñez sería significativamente menores que en las vacas. Si se realiza inseminación artificial y la infección se ha instalado en las hembras, el número de servicios por concepción sería elevado, de 3 a 5.

Esta enfermedad puede estar presente junto a la vibriosis bovina con la que tiene muchos puntos en común.

El diagnóstico en el rodeo puede confirmarse mediante el examen del toro, de la vaca, o bien de algún feto abortado. Usualmente el diagnóstico se hace en el macho por ser más práctico y seguro.

El examen puede hacerse por la prueba de la vaquillona virgen, por observación microscópica directa o mediante cultivos.

La técnica de la vaquillona virgen es costosa, lenta y poco práctica y consiste en hacer servir 3 o 4 hembras con el toro probablemente infectado, y luego efectuar 2 muestreos semanales del área cervicovaginal entre la primera y segunda semana postservicio para evidenciar al parásito por cultivo u observación directa. Esta técnica

no se recomienda.

Medios de cultivo.

El desarrollo del flagelo en medios apropiados es de gran importancia, pues la eficiencia del diagnóstico está basada en la elección de un buen método de muestreo y cultivo posterior.

Si bien son muchos los medios que se pueden utilizar, hay que tener en cuenta su eficiencia, bajo costo y fácil preparación.

Por las características bioquímicas del parásito, casi todos los medios deben tener un hidrato de carbono y una fuente protéica además de sustancias reductoras de la tensión de oxígeno, por ser anaerobio tolerante; de allí que la mayoría de los autores insisten en recomendar que el envase de los medios debe ser un tubo con tapa a rosca.

Otro factor es la adición de suero inactivado para destruir las aglutininas que pudiera tener. Existen medios que se enriquecen con yema de huevo en porcentajes similares al suero, con buenos resultados.

La adición de antibióticos y fungicidas es una condición importante para inhibir el desarrollo bacteriano ya que la fase de división binaria del parásito es muy lenta. Por lo tanto hay que evitar que las bacterias compitan por el sustrato, alterando las tensiones de oxígeno y produciendo metabolitos tóxicos que impidan el buen desarrollo del parásito. Considerando la población normal bacteriana en prepucio y las condiciones de trabajo a campo, se deberá poner énfasis en obtener muestras limpias, sin tierra y sin heces, ya que contaminan rápidamente los medios. La elección de los antibióticos es importante teniendo especial cuidado en emplear productos de

calidad probada.

Los medios de cultivo que mejores resultados han tenido son los siguientes:

- Medio de Plastridge modificado por Sutherland, Simmons y Bell.
- Medio de Plastridge modificado por Fitzgerald y col.
- Medio de Diamond modificado por Abbit y Ball.
- Medio de thioglicolato enriquecido con suero al 10%.
- Trichomona medio Oxoid.
- Medios con leche descremada.
- Medio Macrotric.

Los medios con leche descremada son muy difundidos por su fácil preparación y bajo costo; la leche en polvo que se utilice no debe estar vencida, ya que produciría un crecimiento deficiente. También es importante que a un medio como éste se le agreguen antibióticos, por la gran facilidad con la que se contaminan.

Las muestras deben incubarse a 37°C durante 8 días, si la población es abundante, lo usual es que el cultivo de positivo entre los días 2 y 5 de incubación.

Para aquellos medios que tienen agar en su composición se procederá a su fraccionamiento cuando éste se encuentre bien disuelto. Si se fracciona en frío y el agar no se distribuyó bien, habrá fallas en el crecimiento, pues el agar baja la tensión de oxígeno, favoreciendo la microaerofilia y por ende el desarrollo.

Cuando se efectúe la observación microscópica del medio de cultivo se tomará en cuenta que el desarrollo de *T. foetus* tiende a ocupar la parte inferior del envase, por lo que es conveniente homogeneizar el contenido.

Cultivo de *Trichomona.*

Al laboratorio llegan las muestras en el medio de cultivo, ya que las muestras se obtienen luego del raspado de los toros.

Verificar que los tubos estén perfectamente identificados.

Llevar los tubos a la estufa de cultivo a 37°C durante 7 días.

Durante los 7 días se procede a la observación microscópica de los medios.

Cuando se efectúe la observación microscópica de un medio de cultivo se tomará en cuenta que el desarrollo de *T. foetus* tiende a ocupar la parte inferior del envase, por lo que es conveniente homogeneizar el contenido.

Observación microscópica.

Tomar una gota de medio con una ansa de bacteriología

Depositar la gota sobre el portaobjetos

Colocar un cubre sobre la gota.

Observar en microscopio óptico, primero con un aumento de 10X para localizar el preparado y luego se observa con 40X para observar si se presentan movimientos circulares del medio, es característico el movimiento en ola que presentan las *Trichomonas.* La ausencia de movimientos durante 7 días de cultivo y observación, demuestran que el cultivo es negativo.

BIBLIOGRAFIA.

- BRUCELOSIS BOVINA. INMUNOPATOGENIA. E. F.F. PENNIMPEDE, C. DI LORENZO, R. TREBUCQ. AVANCES EN MEDICINA VETERINARIA. VOL I, N° 1. 1996
- BRUCELLA abortus: CONSIDERACIONES SOBRE SU INMUNOPATOGENIA EN EL BOVINO. PENNIMPEDE, E.F.F., TREBUCQ, R., DI LORENZO, C., BEERNAGOZZI, J. A. ANALECTA VETERINARIA. VOL II. 1996.
- JORNADAS SOBRE ACREDITACION PARA VETERINARIOS EN BRUCELOSIS BOVINA. RESOL. 1269/93. F.C.V.U.N.L.P. 1996.
- CURSO DE ACTUALIZACION EN BRUCELOSIS BOVINA. F.C.V.U.B.A. 1998.
- ANATOMIA PATOLOGICA ESPECIAL VETERINARIA. E. DAHME, E. WEISS.1989.
- ENFERMEDADES DEL CERDO. R. NEUNDORF, H. SEIDEL
- MEDICINA VETERINARIA. BLOOD, RADOSTITIS. VOL I Y II.
- ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARA SITARIAS CAUSANTES DE INFERTILIDAD. CIAVT. 1992.
- PARASITOS INTERNOS DE LOS BOVINOS DE LA PAMPA HUMEDA. P. STEFAN, C. FIEL Y J. COSTA.
- PARASITOLOGIA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS EN LOS ANIMALES DOMESTICOS. E. J. L. SOULSBY. 7° ED.1990.
- REPRODUCCION ANIMAL. R. ZENJAMIS. 1980
- VIROLOGIA VETERINARIA, MOHANTY; DUTTA. 1990.
- COMPENDIO DE BACTERILOGÍA VETERINARIA. NICOLET.