

LA MUESTRA: CLAVES PARA EL DIAGNÓSTICO

El esfuerzo de un veterinario de levantarse temprano un domingo, para hacer una investigación y recuperar muestras, sangrar animales, viajar distancias, comprar material, empacar las muestras, llevarlas a la compañía transportadora y hacer varias llamadas telefónicas deja exhausto a cualquiera.

Sin embargo, resulta frustrante cuando después, el laboratorio, nos comunica que las muestras no eran adecuadas, que llegaron en malas condiciones o que los envases se rompieron. La próxima vez mejor ni salir a investigar. ¡No! A continuación repasamos la forma ideal de tomar muestras y la mejor manera de enviarlas.

La muestra sanguínea: suero, plasma, sangre: las muestras deben ser recolectadas usando recipientes estériles (aguja, jeringa, tubo, etc.) uno por animal, e identificados (especie, edad, sexo, fecha). En el caso de usar jeringa, la sangre puede hemolizarse al meter la muestra en el tubo de ensayo si no se toman ciertas medidas:

Hay que remover la aguja, reposar la punta de la jeringa contra la pared interior del tubo estéril y lentamente expulsar la muestra de sangre, asegurando que así resbale contra el fondo del tubo. En un lugar seguro y sombreado se puede dejar reposar el tubo de sangre para que coagule y se pueda extraer el suero. Si el animal está en período febril, sería ideal tomar una muestra de sangre completa o sea sin coagular, para que el laboratorio intente identificar un agente causal en la sangre directamente. Los anticoagulantes más comunes son el EDTA y Heparina. La toma de muestra se haría igual que con el suero, pero tomando más precauciones de que la muestra se mantenga siempre estéril. Esta muestra de sangre entera nunca debe congelarse, ya que se destruirían los glóbulos y limitaría la posibilidad de aislar un agente. En el laboratorio al centrifugar la muestra completa se podría separar plasma de la parte celular de esta muestra. El plasma, así como el suero obtenido después de la coagulación, sirve para estudios serológicos.

Muestras de tejidos: haga necropsias en toda oportunidad. No solamente podrá hallar macroscópicamente posibles causas del problema y obtener un informe más completo, sino también sirve para repasar conocimientos de anatomía, fisiología y mejorar habilidades en el empleo del cuchillo en la disección.

MUESTRAS PARA MICROBIOLOGÍA

1) Problemas vesiculares: tome muestras de la lesión. A veces hay que raspar (tijera abierta o con cuchilla) el epitelio y arrancar una muestra suficientemente grande para su mejor rendimiento en diferentes pruebas de laboratorio. Una costra que cubra la herida NO es buena muestra ya que contiene células muertas, pus, etc. Las muestras deben enviarse en glicerina o refrigeradas. Si hay líquido vesicular, use una jeringa estéril para su colección.

2) Frotis de sangre deben ser secados al aire: envueltos en papel y encintados.

3) Efusiones, exudados u otros líquidos corporales pueden envasarse en tubos estériles o en la misma jeringa en que se tomaron asegurándose de que estén bien tapados (quemando y hermetizando la punta) y que el embolo no se mueva. Mandelos refrigerados.

4) Organos en bloque de 50-150 gr. (higado, bazo, riñón, pulmón, corazón, encefalo, etc.) separados en diferentes bolsas de plástico. Mandelos refrigerados.

5) Si fuera necesario tome muestras de secciones de intestino con su contenido de 10-20 cm. de longitud. Esta muestra debe ser la última para estudios microbiológicos, ya que el peligro de contaminar los otros organos es alto. Sin embargo, para evitar que los contenidos seleccionados cambien de ubicación haga una doble ligadura en los extremos antes de continuar con la necropsia.

MUESTRAS PARA HISTOPATOLOGÍA

1) Todas las muestras que se tomen para histopatología deben ser colocadas en formol al 10%. La glicerina, alcohol al 70%, solución salina fisiológica, etc. no sirven para este propósito. La cantidad de formol debe exceder el volumen de tejido 10 a 1.

2) Deben ser colectados tejidos de TODOS los órganos aunque no muestren lesiones aparentes.

3) La muestra perfecta es aquella que siendo delgada (0.2 a 0.5 cm) y pequeña tiene parte de la lesión y parte de tejido normal.

USE siempre bisturí o cuchillo afilado para obtener sus muestras, siempre cortando NO aplastando, NUNCA use tijeras.

4) No tenga miedo de cortar el órgano en cuestión en varios lugares buscando la mejor muestra o hasta incluir varios cortes.

5) NUNCA meta un órgano completo en formol si no está previamente cortado (por ejemplo: ganglio linfático).

ASEGURESE de que haya suficiente formol.

6) Si se van a enviar las muestras por flete, es ideal que se envíen en frascos de PLASTICO con rosca, ya que el vidrio podría romperse. Encinte la tapa con cinta aislante (eléctrica) aplicándola en la misma dirección del cierre de la tapa asegurando así su hermeticidad.

7) No hay que refrigerar las muestras que fueron fijadas en formol y NUNCA LOS CONGELE. Otras muestras pertinentes: Usted está haciendo una investigación. Si determina en su opinión profesional, que se trata de una posible toxicosis, incluya con las demás muestras, una bolsa llena de alimento o una jarra (plástico) de aguadél bebedero.

Ectoparásitos o larvas de algunas miasis pueden también ser clave para un problema en el campo. Inspeccione la piel y colecte los ectoparásitos en un frasco de alcohol (70%).

ENVÍO DE MUESTRAS

1) Envíe las muestras con una historia clínica DETAL LADA del caso o casos y una relación del contenido de la caja. Esta hoja no solamente describe sus hallazgos, sino también es una imagen de usted ante otros colegas. Hagalo con orgullo y profesionalismo.

2) Piense en todos los percances: envuelva las muestras con bolsas de plástico, cerrandolas bien. Separe las muestras en formol de las de microbiología ya que si se derramase el formol podría inactivar algún germen. Ideal sería mandar los frascos de formol (uno por animal) o dos si se envía el encéfalo en una caja separada; pero si esto no fuese posible coloque los frascos de formol en el fondo de la caja.

Utilice periódico arrugado para evitar que las muestras se golpeen entre si.: Haga fotocopias de sus documentos e incluyalos dentro de la caja; otras las debe colocar en un sobre y adherirlas a la parte de afuera de la caja; y otra copia para su propio archivo.

3) De preferencia use bolsas de refrigerante congelado para asegurar la larga duración de la refrigeración para el transporte. Si usa hielo normal (lo cual no es ideal ya que al descongelarse dañaría la caja y es problemático para los empleados de las empresas de transporte), póngalo en varias bolsas de plástico cerradas para evitar derrames.

4) Comuníquese con el laboratorio u oficina proporcionando el nombre de la empresa de transporte, día y hora de salida, día y hora de llegada probable y número de guía.

**Tomado textual del Boletín del Centro para la Prevención de la F. Aftosa. Vol. 3 N° 1 - Abril, 1990.*

INVESTIGACION DE CAUSA DE ABORTO

REMISIÓN DE MUESTRAS

Que la fertilidad es el factor de mayor incidencia en la producción total de un rodeo hoy en día nadie lo discute.

Sin embargo existe la tendencia a confundir fertilidad con porcentaje de preñez. Es importante considerar que el ciclo reproductivo abarca desde el servicio hasta el destete y que el rodeo más fértil es el que desteta anualmente el mayor porcentaje de terneros. Un vientre preñado al tacto, que no llega a destetar su ternero, cuesta al productor más dinero que el que queda vacío, ya que hay que alimentarlo, cuidarlo e invertir en sanidad durante un período de tiempo al cabo del cual no produce nada. El aborto junto con la muerte perinatal constituyen las pérdidas económicas más significativas en la explotación animal.

El problema es aún mayor si consideramos que los vientres abortados pueden ser diseminadores de enfermedad en el rodeo.

De ahí la importancia de llegar a un diagnóstico correcto para poder implementar adecuadas medidas de prevención y control.

La etiología del aborto puede ser muy variada. Hay causas no infecciosas que pueden tener orígenes varios, tales como ambientales, tóxicas, hormonales y/o genéticas, y causas infecciosas que son las que nos ocupan por ser las más comunes y potencialmente peligrosas.

Dentro de la etiología bacteriana debemos considerar la presencia de *Brucella abortus*, que sigue siendo la principal causa de aborto en nuestro país, *Campylobacter fetus* subespecie *fetus* y subespecie *venerealis*, *Leptospira interrogans*, *Actinomyces (Corinebacterium) pyogenes* y *Listeria monocytogenes*; entre los agentes de origen parasitario principalmente *Trichomonas foetus*.

Los virus involucrados son el *Virus de Rinotraquítis Infecciosa Bovina (IBR)* y el mal denominado *Virus de Diarrea Viral Bovina/Enfermedad de las Mucosas* ya que también produce aborto. La infecciones virales están asociadas a problemas de infertilidad, repetición de celos, reabsorción embrionaria, muertes perinatales, malformaciones congénitas, nacimiento de terneros ciegos o pelados, etc.

Durante los últimos años, la tecnología disponible ha logrado avanzar significativamente en la caracterización de los agentes causales de aborto. Pero para que el diagnóstico sea exitoso se debe trabajar indefectiblemente con una muestra apropiada.

Ningún laboratorio podrá realizar un buen trabajo a partir de una muestra mal conservada o mal remitida.

FETO: la muestra más apropiada para diagnosticar causa de aborto es el feto recién abortado o el que se obtiene lo más fresco posible una vez eliminado. Si bien no es una muestra que se encuentra a campo fácilmente, es importante saber que el feto es casi un libro abierto, y que a partir de sus órganos se puede investigar con mayor probabilidad de éxito. De ahí que todo el esfuerzo empeñado para lograr este objetivo tendrá su recompensa.

El feto abortado puede remitirse al laboratorio entero, lo más rápido posible una vez obtenido, dentro de una bolsa de nylon y colocado en una conservadora con refrigerante. Si estuviera contaminado con barro o materia fecal puede lavarse con agua antes de embolsarlo. Si el tamaño del feto fuera demasiado grande, se pueden cortar sus extremidades.

También puede realizarse la necropsia, tomando las debidas precauciones para evitar riesgos del operador y remitir muestras de órganos fetales. Es importante enviar las muestras por separado, ya sea colocándolas en recipientes estériles para tal fin o en su defecto en frascos limpios y secos, si fueran hervidos mejor, o en bolsas nuevas de nylon que son prácticamente estériles. Un buen sistema es utilizar los guantes de tacto, colocando un trozo de órgano en cada uno de los dedos del mismo.

No debe dejar de remitirse un trozo de *riñón*, *líquido abomasal* (contenido de cuajo en una jeringa obturando su extremo) y *pulmón*. De ser posible remitir también una muestra de humor acuoso y sangre del corazón. Por supuesto que también pueden enviarse otros órganos pero los mencionados en primer lugar son casi imprescindibles.

PLACENTA Y/O MEMBRANAS FETALES: si se encuentra puede incluirse también un trozo de placenta con tres o cuatro cotiledones y las membranas fetales.

DESCARGA GENITAL: la remisión de esta muestra se informa por separado en "Diagnóstico de Patógenos de la Reproducción".

SANGRE DE LA MADRE: en todos los casos las muestras pueden acompañarse de un tubo con sangre de la madre abortada para estudio serológico. Si la hembra permanece en el establecimiento es conveniente remitir una segunda muestra 15 a 20 días después de la primera ya que puede permitir llegar al diagnóstico por seroconversión, sobre todo cuando no se lograra diagnosticar la causa del aborto a partir del feto o la descarga genital.

TECNICAS DE MUESTREO PARA EL DIAGNOSTICO DE LA CAMPYLOBACTERIOSIS Y TRICHOMONIASIS GENITAL BOVINA

Nota tomada del libro "Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Campylobacteriosis y Trichomoniasis Genital Bovina" (pág. 3 a 7), documento elaborado por la "Comisión Científica Permanente de Enfermedades Venéreas de los Bovinos de la AAVLD" y publicado por "CERBAS- INTA EEA Balcarce" en diciembre de 1992.

El mismo contiene una selección de las mejores metodologías disponibles de aplicación práctica:

TECNICAS DE MUESTREO

1. MUESTREO EN TOROS

Generalmente el diagnóstico de rutina se efectúa en el macho, por ser más práctico y seguro por su condición de estar infectado en forma permanente y también debido a la disminución de costo al tomar un menor número de muestras. Esta Comisión recomienda el muestreo individual desaconsejando realizar mezclas de lavajes prepuciales o "pools" porque se disminuye la sensibilidad del método de diagnóstico.

1.1 Consideraciones generales

El profesional a cargo del establecimiento considerará el número de muestreos a realizar en cada caso, teniendo en cuenta los antecedentes reproductivos del rodeo, como ser: historia previa de enfermedades venéreas, porcentaje actual de preñez, etc. En aquellos establecimientos donde se efectúe un control sanitario periódico, sin antecedentes de enfermedades venéreas y con altos porcentajes de preñez actuales, se realizarán un mínimo de dos o preferentemente tres muestreos. Si los mismos resultaran negativos el rodeo será considerado libre de trichomoniasis y campylobacteriosis. Por el contrario, si se desconoce la historia reproductiva del rodeo, o bien los antecedentes y situación actual del mismo indican la presencia de enfermedades venéreas, el número mínimo de muestreos a realizar es cuatro. Si aparecieran animales positivos se realizarán tantos muestreos como sean necesarios, hasta obtener en toda la toreada dos muestreos negativos sucesivos, después del último positivo hallado. Los intervalos entre los muestreos no deben ser menores de 10 días, para que no se obtengan resultados falsos negativos debido al recambio de la población prepucial.

1.2 Extracción del esmegma prepucial

Antiguamente se utilizaba la técnica de Adler, denominado también método de la vaquillona virgen, (Stoessel 1982) que consistía en servir hembras vírgenes por un toro problema y luego constatar la presencia de *T. foetus* (por observación directa o cultivo) y *C. fetus* (por cultivo). La lentitud y falta de practicidad del método determinaron la adopción de otras metodologías. Varios autores han empleado indistintamente la pipeta (Bartlett 1949), el raspador (Sutka y Katai 1969, Del Campo et al 1971) o el lavaje prepucial (Fitzgerald et al 1952), obteniendo diferentes resultados en lo que respecta a eficiencia de recuperación de microorganismos. Como cada uno de los métodos posee ventajas e inconvenientes esta Comisión no recomienda ninguno en especial.

1.2.1 Método de la pipeta

Originalmente se utilizó la pipeta de Bartlett (1949), que consistía en un tubo de vidrio de 54 cm. de largo y con uno de sus extremos acodado, el cual se introducía en la cavidad prepucial mientras que en el extremo opuesto se colocaba un tubo de látex por donde se aspiraba el material. Este método fue modificado posteriormente utilizando otras variables como pipetas de inseminación artificial, a las que se conecta una pera de goma para aspirar el esmegma o a veces la succión se realiza mediante una jeringa con intermediario de goma entre ésta y la pipeta.

Actualmente se utilizan las vainas azules descartables de Cassou, las mismas que se emplean para inseminación artificial con pastillas, con el dispositivo metálico de 45 cm de largo por 3 mm de diámetro por el cual se acopla. Estas vainas azules se comercializan en paquetes estériles de 20 unidades cada uno. Es muy importante no manipular el extremo anterior estéril para evitar la introducción de contaminantes durante el armado del émbolo interno y el anillo posterior de traba. Este sistema permite extraer una buena cantidad de esmegma, y a su vez evita que dicho material tenga contacto directo con el anillo prepucial, con lo cual se disminuyen las posibilidades de contaminación. Se recomienda por lo tanto utilizar la pipeta de Cassou cuando las muestras se destinen a cultivo. Las desventajas citadas por algunos autores, como pequeños traumatismos en la mucosa y resistencia por parte del toro, pueden evitarse si la introducción de la pipeta en la cavidad prepucial se efectúa cuidadosamente. Se deberá poner especial cuidado en realizar la extracción de la muestra en el área del glande del pene y fornix. Dicho método de muestreo puede resultar un poco más complicado cuando se trabaja con toros *Bos indicus* por la mayor longitud de su cavidad prepucial.

1.2.2 Método del raspador

En un principio se utilizó el denominado raspador a resorte (Del Campo et al 1971, Ostrowski et al 1974) y luego el torneado (Sutka y Katai 1969, Tedesco et al 1976). Los raspadores son instrumentos metálicos de 70 cm de largo que tienen un extremo anterior ranurado de aproximadamente 10 cm de largo y 8 mm de diámetro, por medio del cual se facilita la acción del raspado de los pliegues prepuciales. El raspador se introduce en la cavidad prepucial, efectuando 20 a 30 movimientos en sentido antero posterior. Luego el material recogido es inoculado en los correspondientes medios de transporte o solución salina fisiológica tamponada (bufferada) de fosfatos (PBS) cuando sea necesario efectuar el cultivo, o bien en solución salina formolada para inmunofluorescencia efectuando movimientos rotatorios para desprender el esmegma de las ranuras del instrumento. El raspador *siempre debe esterilizarse antes de muestrear cada animal*, mediante fuego directo o a ebullición en agua durante 5 minutos y posterior enjuague en solución fisiológica. Muchos autores han avalado su empleo por la rapidez con la que se opera y por la sencillez del método, pero debe recordarse que el riesgo de contaminación es mayor que con el método de la pipeta.

1.2.3 Método de lavaje prepucial

Este método denominado también de la ducha está basado en la introducción de PBS dentro del prepucio (Fitzgerald et al 1952) para ello se utiliza una pipeta de inseminación artificial, a la que se le conecta un tubo de látex de aproximadamente 60 cm. Este tubo de látex está adosado por su otro extremo a un frasco o jeringa que contiene PBS. Una vez introducida la solución, se cierra con una mano el orificio prepucial para evitar su salida y se efectúan vigorosos masajes en sentido cráneo-caudal durante aproximadamente 1 minuto. Posteriormente se recoge el líquido en un frasco, dejándolo caer por gravedad a través de la goma. Todo el instrumental debe ser esterilizado por ebullición durante por lo menos 5 minutos. Actualmente este método se ha dejado de lado por lo tedioso que resulta y, además, porque en algunos toros la introducción de líquido estimula la micción.

1.2.4 Método del hisopo

Consiste en frotar la mucosa peneana mediante una torunda de gasa adosada a un mango de madera de 14 cm de largo (Briano et al 1973). Si bien este método no resulta práctico a campo, se ha aconsejado su utilización en toros de inseminación artificial pues puede aprovecharse el momento del salto para aprovechar el hisopado (Gibson et al 1970).

1.3 Técnicas de extracción de semen

Puede utilizarse la técnica de electroeyaculación, el empleo de la vagina artificial o el masaje de las ampollas y vesículas seminales. También puede procesarse para cultivo el semen procedente de pastillas o pajuélas conservadas

en nitrógeno líquido.

1.4 Recomendaciones

El laboratorista podrá efectuar algunas sugerencias al profesional veterinario encargado del establecimiento de campo, a saber:

- 1) Los muestreos se iniciaran luego de 30 días de retirados los toros del servicio. Esta medida permitirá realizar los muestreos con suficiente antelación y realizar las medidas de manejo adecuadas si existiera la presencia de una o ambas enfermedades.
- 2) Se debe trabajar en condiciones higiénicas, para ello enfatizamos la necesidad de efectuar una correcta "toilette" o limpieza del área prepucial en el momento de extracción de la muestra, cualquiera sea el método que se utilice. Deben cortarse los pelos del anillo prepucial y, en el caso de constatarse la presencia de materia fecal o barro, se lavará la zona del anillo con agua o preferiblemente PBS pH 7,2 y posterior secado con toallas de papel descartable. Este procedimiento evitará el desarrollo de otros gérmenes de la flora prepucial que al tener menor tiempo generacional que *C. fetus* y *T. foetus* sobrecrecen y contaminan los cultivos con el riesgo de obtener resultados "falsos negativos".
- 3) En aquellos casos en los que se utilizan soluciones de muestreo se debe constatar siempre el pH de las mismas.
- 4) Respetar las indicaciones contempladas en cada técnica de muestreo sin introducir innovaciones personales.
- 5) Considerar la limitante de tiempo que tiene cada medio de transporte (ver más adelante), especialmente cuando se emplea PBS no debe transcurrir más de 6 horas desde la extracción de la muestra hasta la siembra.
- 6) Deben realizarse un mínimo de 4 muestreos postmedicación en aquellos animales que se han tratado y comenzar con los mismos luego de transcurridos 30 a 45 días de finalizado el tratamiento.

2. MUESTREO EN HEMBRAS

2.1 Consideraciones generales

La eficiencia en el diagnóstico de las enfermedades venéreas aumenta cuanto más próxima a la infección inicial se realiza la obtención de las muestras de mucus vaginal. La presencia de animales positivos a una o ambas enfermedades solo tiene valor desde el punto de vista del rodeo infectado pero carece de utilidad como diagnóstico individual. Las muestras deben extraerse cuando se observen hembras que repiten celo, luego de retirados los toros del servicio, o bien en el momento del tacto rectal al detectar las hembras vacías. Un muestreo de 10- 20 % de animales permitirá registrar datos de valor. Sin embargo, si dicho muestreo se realiza distante de la época de retirados los toros de servicio (más de 4 meses) el valor de una muestra negativa es relativo, mientras que todo diagnóstico positivo por cultivo debe ser considerado de importancia. El hecho de obtener un solo muestreo con resultado negativo no es suficiente si se tienen en cuenta las variaciones provocadas por el ciclo estral y el momento en que se produce la infección. La aparición de inmunoglobulinas locales se inicia dentro del primer mes de post- infección produciéndose la negativización del animal infectado en un período de 90 a 120 días. Pese a lo expuesto, trabajos realizados en nuestro país y en el exterior demostraron la persistencia de infección para *C. fetus* (Cipolla et al 1991) y *T. foetus* (Skirrow y Bon Durant 1989), durante períodos de más de un año incluso en vacas preñadas con su gestación a término. Si bien el porcentaje de dichas vacas portadoras es bajo para *T. foetus* y es desconocido para *C. fetus*, su presencia asegura la reinfección de enfermedades venéreas en el rodeo.

El momento más adecuado del ciclo estral para realizar el muestreo es motivo de discusión. Si bien, la mayoría de los autores mencionan que se obtiene una mayor eficiencia en el diagnóstico cuanto más próxima al celo se obtenga la muestra, los trabajos experimentales del INTA, EEA Balcarce, permiten asegurar que existen buenas posibilidades de aislamiento para ambos agentes en cualquier momento del ciclo, siempre que se empleen métodos microbiológicos y medios de cultivo apropiados.

2.2 Técnica de extracción de mucus vaginal

Las secreciones uterinas y el mucus vaginal pueden ser recolectados tanto de la vaca abortada como del vientre vacío al tacto, desde la porción posterior del cérvix y fondo de la vagina mediante aspiración con pipeta de inseminación artificial e intermediario de goma y jeringa o bien directamente mediante las mencionadas vainas descartables de Cassou. Esta es la técnica más recomendable por su practicidad. Separando ambos labios vulvares, sin necesidad de fijar el cérvix por vía rectal, se introduce el instrumento armado hasta el área dorso- craneal de la vagina realizando movimientos de aspiración con el extremo posterior del instrumento a medida que se retira hacia caudal. El vacío originado por el pequeño émbolo de plástico que se encuentra dentro de la vaina es suficiente para extraer volúmenes de mucus que varían de acuerdo al momento del ciclo estral. En un bajo porcentaje de animales el volumen de mucus extraído puede ser escaso, en estos casos se puede introducir con dicha pipeta de 3 a 5 ml de solución fisiológica estéril para realizar un lavado del fondo de vagina e inmediatamente extraer el líquido por aspiración. La pipeta de Cassou es adecuada para sembrar directamente los medios que se describen más adelante.

Existen otras técnicas de muestreo que son mucho menos prácticas. Uno de los métodos consiste en introducir como espéculo un tubo de acero y luego deslizar a través del mismo una pipeta plástica de inseminación artificial la que se utiliza para aspirar el mucus vaginal mediante jeringa y tubo intermediario de goma. Otras técnicas, como la pipeta de vidrio de Bartlett o la aguja metálica de Nielsen (Stoessel 1982) no se utilizan más por ser complicadas y poco accesibles.

2.3 Precauciones

En todos los muestreos es muy importante realizar una correcta higiene. Cuando el área del periné y vulva se encuentra sucia con materia fecal, se deberá solicitar a un operario fijar la cola del animal y entonces se procederá a realizar su lavado con agua común y una esponja, secando luego los labios vulvares con toalla de papel. No se aconseja el empleo de soluciones desinfectantes, cuyos residuos puedan ser arrastrados con la pipeta, e interferir posteriormente con los cultivos.

No debe olvidarse que otros agentes tales como *Brucella abortus* pueden estar involucrados como causales de aborto, por lo que deben tomarse los recaudos correspondientes al obtener la muestra. A veces la consistencia del mucus es muy viscosa y filante, siendo dificultoso el llenado de los tubos con medio de cultivo. En esos casos se recomienda utilizar los tubos con tapa a rosca y ayudarse con el tapón. Dado que la supervivencia de *C. fetus* y *T. foetus* dentro de la pipeta de muestreo no es prolongada se aconseja utilizar los medios de cultivo y/o transporte que se citan más adelante.

En algunos casos puede introducirse por error la pipeta en la uretra, recolectándose orina, la cual puede reconocerse al extraerla. En ese caso se deberá repetir el muestreo. Respetando los pasos enunciados los riesgos de extraer una muestra contaminada en condiciones de campo son mínimos.

3. MUESTREOS DE FETOS Y PLACENTAS

Lo ideal es enviar el feto completo para su necropsia y posterior recolección aséptica de órganos. Puesto que el tracto gastro- intestinal del feto es estéril se asegura la supervivencia de los agentes etiológicos durante varias horas. También

se puede enviar un trozo de placenta con 3 o 4 cotiledones, aunque el alto grado de contaminación habitual de este material limita su uso. Si se necropsia el feto el material ideal para cultivo de ambos agentes es el líquido abomaso. Para el caso de *C. fetus* también son adecuados los pulmones. Para el diagnóstico rápido de *C. fetus* se puede realizar la tinción de *Ziehl Neelsen modificada* (Briano et al 1973) a partir de frotis de líquido de abomaso o bien realizar la *técnica de inmunofluorescencia* con el mismo material. Las *T. foetus* pueden observarse directamente en preparaciones frescas de líquido de abomaso.

4. SIEMBRA Y TRANSPORTE DEL MATERIAL MUESTREADO

4.1 Trichomoniasis

Se pueden sembrar en forma directa cualquiera de los medios que se citan más adelante, ya que sirven tanto para transporte como para cultivo. Se depositan aproximadamente 0,5 ml de líquido de abomaso, mucus vaginal y esmegma prepucial. También se puede colocar el material en 5 ml de PBS pH 7- 7,2 y luego subcultivar. Si se desea adelantar el diagnóstico es posible intentar la búsqueda de protozoarios por observación microscópica directa.

4.2 Campylobacteriosis

Para el aislamiento de *C. fetus* se recomienda utilizar medios de transporte, en particular el medio *Cary- Blair modificado* (Luechtefeld 1981), que pueden ser sembrados mediante la adición de aproximadamente 0,5 de material prepucial, vaginal o líquido de abomaso en el fondo del tubo. Las muestras para inmunofluorescencia.

SUGERENCIAS PARA LA TOMA Y REMISION DE MUESTRAS PARA DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS BOVINAS

*Dra. Susana Conigliaro**

Muchas veces los síntomas observados permiten realizar un diagnóstico clínico de enfermedad y entonces la confirmación por parte del laboratorio puede considerarse innecesaria. Pero hay ocasiones, sin embargo, en que el veterinario clínico o sanitarista necesita confirmar su diagnóstico ya sea por la importancia económica de la enfermedad o porque no está seguro de haberlo hecho correctamente.

El diagnóstico es imprescindible además para detectar portadores asintomáticos y certificar la ausencia de algunos agentes en ciertos materiales, como por ejemplo leche, semen etc.

La recolección rápida y el transporte adecuado de las muestras es de importancia primaria para el diagnóstico.

El envío de las muestras debe acompañarse siempre de una breve historia clínica destacando las alteraciones

encontradas durante la necropsia o las manifestaciones clínicas observadas en los animales a muestrear.

Las muestras seleccionadas para estudio bacteriológico y/o virológico deben extraerse en condiciones de higiene extrema y lo más rápido posible después de producida la muerte del animal. Se recomienda que el trozo de órgano o tejido tenga un tamaño aproximado de 10 cm x 10 cm x 10 cm de modo de no crear problemas con el embalaje y conservación y poder lograr, ya en el laboratorio, una toma de muestra en profundidad. Las muestras se colocarán en recipientes estériles ó en su defecto en guantes de tacto descartables o bolsitas de nylon limpias, preferentemente nuevas. No es conveniente colocar muestras diferentes dentro del mismo recipiente.

Las muestras líquidas pueden aspirarse con jeringa y transportarse en las mismas, eliminando el aire e insertando un tapón en el extremo o doblando directamente la aguja y/o con pipeta de inseminación, quemando los extremos para mantener la muestra en condiciones.

Es muy importante acompañar las muestras remitidas de extendidos en portaobjetos para examen al microscopio previa coloración de los mismos, de modo de poder orientar el trabajo, permitiendo estimar la proporción en que se encontraban originariamente los agentes eventualmente recuperados por cultivo.

Estos frotis posibilitan además realizar tinciones con anticuerpos fluorescentes, lo que permite muchas veces llegar a un diagnóstico etiológico en pocas horas. Los frotis deben dejarse secar al aire y luego envolverlos individualmente, dejarlos a temperatura ambiente y remitir lo antes posible.

Las muestras de sangre deben tomarse con jeringas y agujas estériles, en lo posible utilizando una por animal, colocándola en tubos limpios y secos, sin anticoagulante e identificándolas correctamente, no en los tapones sino en los tubos, con letra clara y material indeleble. Se debe tener en cuenta que la sangre puede hemolizarse si se desliza violentamente dentro del tubo a través de la aguja y varias técnicas diagnósticas no permiten trabajar con muestras de sangre hemolizada. Una vez extraída la muestra de sangre debe mantenerse a temperatura ambiente durante 20-30 minutos en lugares templados, inclinando los tubos a 60 grados hasta que se forme el coagulo y proceder luego a la extracción del suero. El suero puede mantenerse refrigerado o congelado. Las muestras de sangre entera nunca deben congelarse, sino

mantenerse a 4º C. Es importante que las muestras de sangre no estén sometidas a diferencias de temperatura y que lleguen al laboratorio dentro de las 48 horas de extraídas.

La forma de remitir y conservar las muestras es sumamente importante. Los laboratorios de diagnóstico no disponen de técnicas que permitan realizar un diagnóstico certero a partir de un material en descomposición o mal embalado.

El frío es el mejor conservador pero las muestras congelados muchas veces no son apropiadas para la recuperación de ciertos agentes, y algunos microorganismos son tan lábiles que requieren de medios de transporte adecuados para su conservación.

Cuando se remiten muestras al laboratorio de diagnóstico es importante avisar sobre el envío de modo de asegurarse su pronta recolección y rápido procesamiento indicando el medio de transporte empleado, la localidad desde donde efectúa el envío y si fuera posible el número de guía que ampara la encomienda.

Es muy importante tener en cuenta al enviar muestras para diagnóstico cual es la más apropiada para cada investigación y la forma más conveniente para remitirla. De la obtención de una buena muestra dependerá parte del éxito del diagnóstico.

A continuación se indica, según la sintomatología observada, cuáles son las muestras mas apropiadas para diagnóstico y como remitirlas.

Cuadro clínico	Animal vivo	Animal muerto	Remitir en	Forma de envío	Agentes frecuentes
Trastornos Respiratorios y Oculares	Hisopados nasales y conjuntivales Sangre (con heparina) para aislamiento. Sangre para serología.	Tejido de áreas afectadas, pulmón, tráquea y ganglios asociados. Sangre con y sin heparina.	Medio de transporte bacteriológico y/o virológico. Recipientes estériles. Tubos, jeringas.	En caja de telgopor con refrigerantes. Para virología retirar el hisopo del medio de transporte	Pasteurella, Haemophilus, Moraxella, Micoplasma, Virus de IBR, BVD, PI3, Parásitos pulmonares.
Trastornos Digestivos Diarrea	Materia fecal Raspado de mucosa rectal. Sangre (con heparina) para aislamiento. Sangre para serología. Agua.	Trozo de intestino ligado. Ganglio mesentérico. Hígado y vesícula biliar. Válvula ileocecal. Sangre con y sin heparina. Agua.	Idem + frotis de mucosa rectal.	Idem.	Escherichia coli, Salmonella, Rotavirus, Coronavirus, Mycobacterium paratuberculosis, Virus de BVD Criptosporidium, Helmintos, Coccidios.
Trastornos nerviosos	Hisopados nasales. Sangre (con heparina) para aislamiento. Sangre para Serología.	Cabeza entera ó muestras de cerebro y/o cerebelo. Líquido cefaloraquídeo.	Recipientes estériles. Medio de transporte bacterio/virológico.	Idem.	Virus de IBR, Listeria, Haemophilus somnus.
Aborto	Descarga genital. Placenta. Sangre de la madre para serología. Orina de la madre.	Feto entero u órganos fetales incluido líquido abomasal, humor acuoso y cerebro. Sangre fetal para serología .	Recipientes estériles. Tubos jeringas. Medio de transporte Cary Blair.	Feto y sangre refrigerado. Feto congelado solo si no hay alternativa.	Brucella, Leptospira , Campylobacter, Haemophilus, Listeria, Salmonella, Corynebacterium, Micoplasma, Chlamidia, Hongos, Virus de IBR-BVD, Trichomonas, Neospora.
Baja fertilidad	Descarga genital. Moco cervico vaginal o contenido uterino. Sangre para aislamiento. Sangre para serología. Suero para perfil mineral. Semen.		Medios de transporte.		