

## **DIAGNOSTICO DE TRICHOMONIASIS Y CAMPYLOBACTERIOSIS**

CDV le envía los siguientes elementos para la toma de muestras para el diagnóstico de estas enfermedades:

- Tubos cónicos conteniendo 5 ml de solución salina tamponada (SST) estéril, pH 7,2 – 7,4.
- Tubos de Khan conteniendo 3,5 ml de medio MACROTRIC (Medio de cultivo para Trichomonas) de color azul-violáceo.
- Pajuelas de PVC estériles descartables para siembra en el medio Macrotric.
- Formol para utilizar en las muestras para diagnóstico de Campylobacteriosis por IFD.
- Protocolo para remisión de muestras y rótulo para el envío.

### **INSTRUCCIONES PARA LA TOMA, ACONDICIONAMIENTO, SIEMBRA Y REMISION DE MUESTRAS**

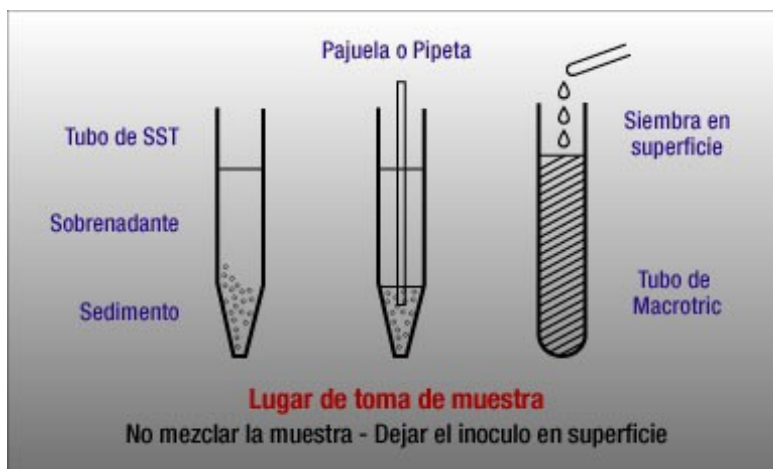
Una vez tomadas las muestras prepucciales (ya sea con pipeta de I.A., raspador o por aspiración), las mismas deben descargarse en los tubos cónicos con SST.

A continuación, se deben dejar que sedimenten durante 2 o 3 hs., manteniendo los tubos en posición vertical o centrifugar a 2000 RPM durante 5 minutos.

### **SIEMBRA PARA TRICHOMONIASIS Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Es conveniente que las muestras se siembren dentro de la 8 hs. de extraídas ya que cuanto antes se realice esta operación, las posibilidades de crecimiento del parásito son mayores, aunque también pueden obtenerse resultados satisfactorios sembrándolos dentro de las 24 hs. Para la siembra en MACROTRIC, se toma material con la pajuela de la interfase sedimento-sobrenadante y se siembran 3 o 4 gotas en la superficie del tubo (**Sobre** el medio y **sin** mezclar). El material a sembrar **tiene** que incluir la parte superior del sedimento.

Una vez sembradas las muestras, se debe formolar el tubo de SST (para el diagnóstico de Campylobacteriosis) descargando en cada uno, una sola gota de formol.



### **REMISION AL LABORATORIO**

Las muestras sembradas en MACROTRIC y las muestras para Campylobacteriosis deben remitirse al laboratorio a **temperatura ambiente** ya que el refrigerado retrasa el desarrollo de Trichomonas e impide la acción del formol en el tubo de SST.

Es conveniente que las muestras para Trichomoniasis lleguen al laboratorio dentro de las 48 hs. de extraídas, aunque una vez sembradas y conservadas a temperatura ambiente, el tiempo de arribo puede demorarse hasta 72 hs.

Para diagnóstico de Campylobacteriosis, el tiempo de envío no influye ya que al estar formolado la muestra se conserva durante mucho tiempo.

## 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:

### **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 fórnix. 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 pajuelas 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.