



**BOLETIN**

**2014**

**Diciembre**

**ASOCIACIÓN ARGENTINA  
DE VETERINARIOS DE  
LABORATORIOS DE  
DIAGNÓSTICO**



# ASOCIACIÓN ARGENTINA DE VETERINARIOS DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO

Fundada el 21 de noviembre de 1984  
Personería Jurídica 439/96  
Afiliada a la World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD)

## BOLETIN AAVLD

2014 Vol. N° 3

Publicación de la AAVLD

### EDITORIAL

*El 29 de noviembre de 2014 en Tucumán, concluyó la XX Reunión Científico-Técnica, con un amplio éxito. Para la Comisión Directiva y quienes participamos en la organización nos sentimos complacidos ya que nuestros objetivos y expectativas se cumplieron. Agradecemos a los socios que participaron, de una forma u otra, de este encuentro entre colegas y amigos, especialmente en esta ocasión especial en donde la AAVLD festejaba su XXX Aniversario.*

*Un especial saludo para la CD saliente por su dedicada labor y a las CC que colaboraron y participaron activamente a través de charlas, talleres y jornadas durante estos dos años de labor. A todos ellos ¡¡¡ FELICIDADES!!!*

*Éxitos a la nueva CD, que continúen trabajando y enarbolando los ideales de los médicos veterinarios fundadores, que son los mismos de todos los que formamos la gran familia de la AAVLD.*

*Solo queda desearles a todos los socios y amigos de esta FAMILIA que es la AAVLD que en estas*



*fiestas navideñas nuestros hogares sean Bendecidos y colmados de Paz y Sabiduría.*

**FELICES FIESTAS**

COMISIÓN DIRECTIVA 2012 – 2014



## ACTUALIZACIÓN DE DATOS.

Por favor, solicitamos a todos los socios mantener actualizados sus datos personales, informando a la Dra. Lorna C. Reid, secretaria de la Asociación ([aavldtucuman2013@gmail.com](mailto:aavldtucuman2013@gmail.com)) o al correo de la Asociación ([aavld@aavld.org.ar](mailto:aavld@aavld.org.ar)) sobre cualquier cambio de domicilio, teléfono, correo postal o e-mail, a fin de hacer fluida la comunicación entre nosotros.

## PÁGINA WEB

Invitamos a nuestros socios a visitar la **página web** de la Asociación en [www.aavld.org.ar](http://www.aavld.org.ar).

Si desean publicar algún trabajo, difundir algún curso, informar sobre alguna nueva reglamentación o algún dato de interés para nuestra actividad, etc, deberán comunicarse con la Dra. Andrea Fiorentino, [aavld@aavld.org.ar](mailto:aavld@aavld.org.ar)

**Les recordamos a todos aquellos socios que tengan al día sus cuotas, podrán acceder, en forma gratuita, a un link profesional propio dentro de la página web de la AAVLD.** Para más información deberán contactarse con la Dra. Andrea Fiorentino: [aavld@aavld.org.ar](mailto:aavld@aavld.org.ar)

Aquellos laboratorios o entidades interesados en colaborar con su soporte económico pueden colocar allí el logo con un link que conecte a la página web de la citada entidad.

## PAGO DE CUOTAS SOCIETARIAS

Se recuerda a los colegas que el pago de la cuota anual (\$300.-) podrá hacerse a través de Depósito o Transferencia bancaria. Por consultas o dudas sobre su deuda podrán contactarse con la Dra. Elvira Falzoni (Tesorera) [elviraFalzoni@hotmail.com](mailto:elviraFalzoni@hotmail.com)

### **Formas de pago**

### **ATENCIÓN: CAMBIO DE NÚMERO DE CUENTA BANCARIA**

Se informa que a partir del 22 de Abril de 2014 hemos transferido la cuenta corriente institucional a la Sucursal 000 del Banco Santander Río, de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, cuyos datos son:

- Depósito en cualquier sucursal del Banco Santander Río, a la Cuenta Corriente Institucional de la AAVLD N° [339421](http://www.aavld.org.ar)

- Transferencia bancaria a la misma cuenta cuyo N° de CBU **0720000720000003394218**
- CUIT de la AAVLD: 30-68652553-4

\* En ambos casos se deberá enviar el comprobante de pago escaneado por mail a: [elviraFalzoni@hotmail.com](mailto:elviraFalzoni@hotmail.com). Indicando nombre y apellido del socio, CUIT, domicilio y código postal correcto. El recibo correspondiente se enviará por correo.

La Asociación no se responsabilizará por un ocasional extravío de correspondencia.

## **PARA ASOCIARSE A LA AAVLD**

**A) Deberá completar y enviar la ficha de inscripción**, junto con el comprobante de depósito bancario (los nuevos aranceles serán notificados próximamente). Consultar a [elviraFalzoni@hotmail.com](mailto:elviraFalzoni@hotmail.com)

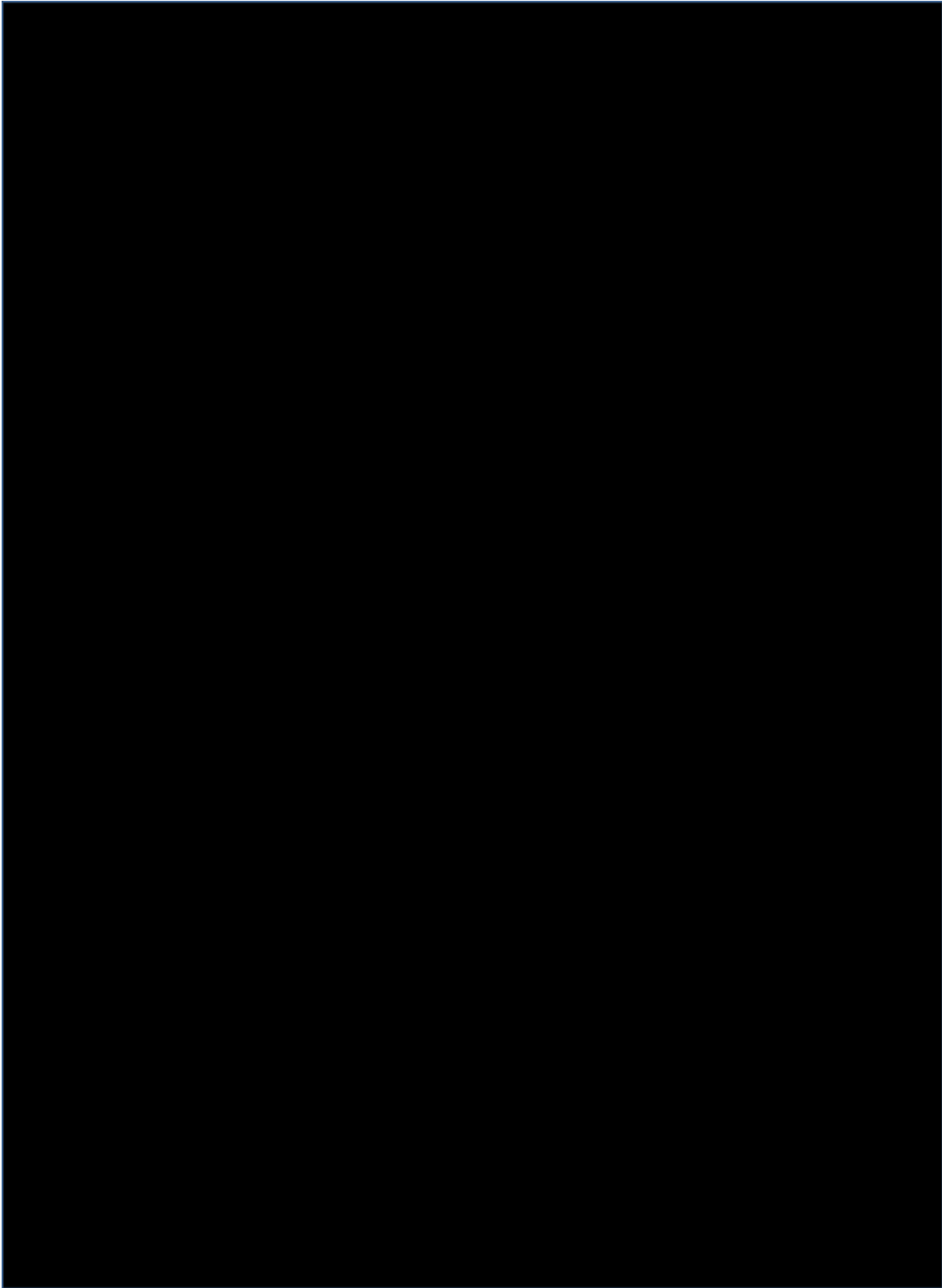
### **B) Formas de pago:**

- Depósito en cualquier sucursal del Banco Santander Río, a la Cuenta Corriente Institucional de la AAVLD N° **339421**
- Transferencia bancaria a la misma cuenta cuyo N° de CBU es **0720000720000003394218.**
- CUIT de la AAVLD: 30-68652553-4

**C) Ficha y comprobante de pago, deberán enviarse escaneados** por mail a Dra. Elvira Falzoni (Tesorera) [elviraFalzoni@hotmail.com](mailto:elviraFalzoni@hotmail.com), indicando a nombre de quién, domicilio y CUIT deberá hacerse el recibo correspondiente.

**COMISIÓN CIENTIFICA DE PATOLOGIA**

*Programa de control de calidad interlaboratorio de bioquímica y enzimología sanguínea (CIAAVLD).*



## NOTA TÉCNICA

Este espacio queda destinado para la publicación o divulgación de trabajos ya presentados por los socios, que sirvan para el enriquecimiento de nuestro conocimiento y para mejorar nuestro desempeño en las tareas de diagnóstico de laboratorio. Por favor enviar los papers a: [aavldtucuman2013@gmail.com](mailto:aavldtucuman2013@gmail.com).

## **TRABAJO SELECCIONADOS Y PREMIADOS en la XX REUNIÓN CIENTIFICO TECNICA**

Se presentaron 113 trabajos de los cuales se preseleccionaron 5, de los cuales 3 fueron premiados. A continuación se exponen los 5 trabajos seleccionados.

### **1° PREMIO**

#### **INMUNOMARCACIÓN ESPECÍFICA CON UNA GAMMAGLOBULINA ANTI-BRUCCELLA POR INMUNOFUORESCENCIA DIRECTA**

SM Estein<sup>1,5</sup>, CS Cacciato<sup>2,4</sup>, HM Echevarría<sup>2</sup>, E Lucchesi<sup>3</sup>, P Soto<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología. <sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental, Centro SAMP-CIVETAN-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro. Campus Universitario, Tandil, Buenos Aires. Argentina. <sup>3</sup>BIOTANDIL. <sup>4</sup>CIC. <sup>5</sup>CONICET. silmares@vet.unicen.edu.ar

**INTRODUCCIÓN:** La detección directa de *Brucella* en diferentes muestras clínicas incluye el empleo de las coloraciones de Gram o Ziehl Neelsen modificado por Stamp. Sin embargo, para determinar el género y la especie es necesario el aislamiento de la bacteria por cultivo y posterior identificación a través del empleo de pruebas bioquímicas. La inmunofluorescencia directa (IFD) es una prueba serológica que permite la detección de un antígeno en distintas muestras mediante el empleo de una técnica sencilla, rápida y reproducible.

El **objetivo** de este trabajo fue evaluar la especificidad de la fracción gammaglobulina de un suero policlonal anti-*Brucella* contra especies del género y bacterias de otros géneros.

#### **MATERIALES Y MÉTODOS:**

**Gammaglobulina anti-*Brucella*:** Elaborado para este trabajo por BIOTANDIL (Laboratorio Biológico de Tandil SRL).

**Preparación de las suspensiones:** Se incluyeron en el ensayo cepas lisas (S) (*Brucella abortus* 544, *B. melitensis* H38, *B. suis* 1330) y rugosas (R) del género *Brucella* (*B. canis* RM6/66, *B. canis* M-, *B. ovis* REO 198). Además, se ensayaron otras bacterias Gram negativas (*Actinobacillus seminis*, *Campylobacter fetus*, *Escherichia coli*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, *Proteus vulgaris*) y Gram positivas (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Trueperella pyogenes* (ex-*Arcanobacterium*)). Las bacterias se cultivaron en Agar Sangre Columbia adicionado con un 10 % de sangre bovina. Se prepararon suspensiones de las bacterias inactivadas con solución fisiológica estéril fenolada ajustadas según el tubo 0,5 de la escala de Mac Farland.

**Técnica de IFD:** Se prepararon 10 diluciones del conjugado: 1/25, 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500 y 1/600. Por otro lado, cada suspensión bacteriana se montó en un portaobjeto de 12 áreas circulares de 7 mm de diámetro. Cada portaobjetos se secó en estufa a 37°C, fue fijado con etanol y lavado con agua destilada. Cada área fue cubierta con la respectiva dilución del conjugado y posteriormente se incubó en cámara húmeda durante 1 hora (al resguardo de la luz). Se realizaron 3 lavados (10 minutos c/u) con tampón fosfato salino (PBS). Finalmente se lavó con agua destilada y se eliminó el exceso de humedad. Se agregó una gota de glicerina tamponada pH 8 en cada área del portaobjetos colocando un cubreobjetos. La lectura se realizó en un microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión (100X).

**RESULTADOS:** En la siguiente Tabla se presentan los resultados obtenidos en la IFD con las distintas suspensiones bacterianas. El conjugado anti-*Brucella* reaccionó fuertemente con las cepas de *Brucella* lisas y en menor grado con las cepas rugosas. No se observaron reacciones significativas con otras bacterias Gram negativas o Gram positivas.

Antígenos	Diluciones conjugado anti- <i>Brucella</i>									
	1/25	1/50	1/75	1/100	1/150	1/200	1/300	1/400	1/500	1/600
<i>B. abortus</i> 544	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>B. melitensis</i> H38	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
<i>B. suis</i> 1330	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>B. canis</i> RM6/66	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
<i>B. canis</i> M-	+	+	+	+		-	-	-	-	-
<i>B. ovis</i> REO 198	+	+	+		-	-	-	-	-	-
<i>A. seminis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. foetus</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. somni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. haemolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. pseudotuberculosis</i>					-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. pyogenes</i>			-	-	-	-	-	-	-	-

**Intensidad de la fluorescencia:** (+++) reacción fuertemente positiva; (++) reacción positiva; (+ |) reacción débilmente positiva; ( |) reacción débil; (-) sin reacción.

#### **DISCUSIÓN:**

Los resultados obtenidos indican que la IFD con el conjugado anti-*Brucella* constituye una técnica sensible y específica que permite, mediante un procedimiento sencillo, la detección rápida de *Brucella* en extendidos o improntas a partir de muestras de animales sospechosos (Ej: semen, fluido abomasal, macerados placenta) o en colonias de un primer aislamiento. El empleo de esta técnica permitiría tener un resultado rápido teniendo en cuenta que los tiempos de cultivo son extensos y que el aislamiento está sujeto a la viabilidad de la bacteria y al empleo de medios de cultivo selectivos que impiden el crecimiento de contaminantes.

#### **BIBLIOGRAFÍA:**

- 1- Ajai CO, Cook JE, Dennis SM. Diagnosing ovine epididymitis by immunofluorescence. Vet Rec. 1980. 107:421-4.
- 2- Thomas KW, McCausland IP. The use of immunochemically purified anti-*Brucella* antibody in a direct fluorescent antibody test for *Brucella abortus*. Vet Immunol Immunopathol. 1980. 1:343-52.

## 1º MENCION

### TRYPANOSOMA EVANSI EN PERRO: PRIMER REPORTE EN ARGENTINA

M. F. Bono Battistoni<sup>1\*</sup>; V. Orcellet<sup>1</sup>; J.L. Peralta<sup>1</sup>; R. Marengo<sup>1</sup>; D. Plaza<sup>1</sup>; A. Brunini<sup>1</sup>; M. Ruiz<sup>2</sup>; N. Widenhorn<sup>3</sup>; A. Sanchez<sup>4</sup>; L. Monje<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Parasitología y Enfermedades Parasitarias, FCV, UNL, RP Kreder 2805, (3080), Esperanza, Santa Fe

<sup>2</sup>Laboratorio de Análisis Clínicos, FCV, UNL, RP Kreder 2805, (3080), Esperanza, Santa Fe

<sup>3</sup>Hospital de Salud Animal, Área Pequeños Animales, FCV, UNL, RP Kreder 2805, (3080), Esperanza, Santa Fe

<sup>4</sup>Laboratorio de Anatomía Patológica, FCV, UNL, RP Kreder 2805, (3080), Esperanza, Santa Fe

<sup>5</sup>Laboratorio de Ecología de Enfermedades, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET Litoral), UNL-CONICET, RP Kreder 2805, (3080), Esperanza, Santa Fe

\*[mfbono@fcv.unl.edu.ar](mailto:mfbono@fcv.unl.edu.ar)

#### Introducción

*Trypanosoma evansi* es un hemoparásito de sección salivaria, clase *Mastigophora*, con amplia distribución mundial. Afecta a gran cantidad de mamíferos domésticos, salvajes y animales de laboratorio. Los más frecuentemente afectados son equinos, camélidos, perros, ciervos y elefantes asiáticos, aunque también se lo puede encontrar infectando suinos, pequeños rumiantes, búfalos y bovinos. Es transmitido mecánicamente por insectos hematófagos de los géneros *Stomoxys* y *Tabanus*. En América Central y del Sur también puede ser transmitido por el *Desmodus rotundus* que actúa como vector y como reservorio. Además de este modo mecánico, *T. evansi* también puede ser transmitido por leche, durante el coito, vía oral mediante el lamido o por ingestión de carne y sangre infectada con el parásito. En perros, puede desarrollar una patología de curso agudo que incluye signos oculares, vasculares y nerviosos. La infección por *T. evansi* puede causar inmunosupresión. Se han reportados casos de infección con *T. evansi* en caninos en Irán, India, Colombia y Afganistán. En casi todos los casos la signología de la enfermedad incluye fiebre intermitente, edema subcutáneo, anemia progresiva, ceguera, estado letárgico y alteraciones hemostáticas. Durante la fase crónica hay mayor compromiso del estado general con recrudescimiento de los síntomas. Nuestro objetivo es reportar el caso de un canino infectado con *T. evansi* en Argentina.

#### Materiales y Métodos

Se trató de un macho, de raza Dogo Argentino, de 14 meses de edad, que vivía en la zona rural de Los Charrúas (31°10'00"S 58°11'00"O), provincia de Entre Ríos. Llegó a la consulta con decaimiento, enflaquecimiento progresivo, inapetencia, linfadenopatía en ganglios preescapulares y poplíteos, mucosas pálidas y pirexia (41° C). Se le realizó hemograma completo, bioquímica sanguínea y una extracción de ADN y dos PCR en tiempo real para determinación de la especie de *Trypanosoma*. El paciente evolucionó desfavorablemente, entró en falla renal y murió. Se realizó necropsia completa de la que se tomó muestras de distintos tejidos que fijados en formol bufferado al 10 % fueron procesados de forma rutinaria para su estudio microscópico.

#### Resultados

El hemograma mostró anemia hipocrómica, trombocitopenia y un leucograma de tipo inflamatorio. En los extendidos sanguíneos se observaron formaciones exoglobulares, que medían entre 25 y 30 µm de largo con una membrana ondulante y un flagelo libre, compatibles con *Trypanosoma* spp. La bioquímica sanguínea reveló leve incremento de la uremia, enzimas hepáticas aumentadas, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia y aumento de la CPK. A la necropsia las principales alteraciones macroscópicas observadas fueron ictericia, hepatomegalia, esplenomegalia y cardiomiopatía dilatada. La histopatología reveló hepatitis con severo estasis biliar, esplenitis con hemosiderosis, metaplasia mieloide, además atrofia de miofibrillas cardíacas rodeadas de células inflamatorias. En riñón, glomerulonefritis membranosa, alteraciones degenerativas tubulares difusas con formación de cilindros hialinos y necrosis tubular multifocal. Las PCR, tanto la dirigida contra la región ITS1 (específica para *T. evansi* y *T. brucei*) y otra contra el gen RoTat que es específica de *T. evansi* dieron positivas, con alta carga de ADN. Por lo hallado

en los extendidos de sangre junto con los resultados de las PCRs, concluimos que *T. evansi* fue el agente etiológico para esta infección.

#### Discusión

Los signos que aquí se describieron sugieren que el animal estaba cursando la fase aguda de la enfermedad en coincidencia con lo descrito en la bibliografía. Si bien la transmisión es a través de la picadura de insectos hematófagos, no se descarta la vía oral por la ingestión de carne cruda de carnívoros o roedores infectados. Este perro vivía en zona rural junto con la madre y dos perros más que un año atrás murieron con cuadros de anemia severa pero sin diagnóstico certero. En Argentina hasta el momento *T. evansi* está descrito en equinos y en carpinchos, pero no en perros, es por ello que este reporte es sumamente relevante. Creemos que es pertinente realizar a corto y mediano plazo estudios sobre prevalencia de este hemoparásito en el país, porque si bien no era considerado patógeno para el hombre, existen casos confirmados en África y en la India.

#### Bibliografía

- Aref, M., Yasin, S.M., Bahear, W., Ghulam, Z., Hastie, L., Dennison, T., Schauwers, W., Büscher, P., Deborggraeve, S., 2013. Canine *Trypanosoma evansi* infection in Afghanistan. *Vet Parasitol* 197: 638–641.
- Brandão, L.P., Larsson Mhama, Birgel, E.H., et al., 2002. Infecção natural pelo *Trypanosoma evansi* em cão-Relato de caso. *Clínica Veterinaria* 36: 23-26.
- Correa-Salgado A.M., Pacheco de Araujo F.A., Cañón-Franco W.A., 2010. Infección Natural por *Trypanosoma evansi* en Canino, Manizales - Colombia: Caso clínico. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.*; 69: 99-100.
- Eberhardt, A.T.; Monje, L.D.; Zurvera, D.A.; Beldomenico, P.M. 2014. Detection of *Trypanosoma evansi* infection in wild capybaras from Argentina using smear microscopy and real-time PCR assays. *Vet Parasitol.* 202: 226 – 233.
- Ravindran, R., J. R. Rao, A. K. Mishra, K. M. L. Pathak, N. Babu, C. C. Satheesh, S. Rahul, 2008. *Trypanosoma evansi* in camels, donkeys and dogs in India: comparison of PCR and light microscopy for detection. *Vet. arhiv* 78, 89-94.

## 2° MENCION

### Evaluación del virus bovino Herpes 4 en rodeos lecheros de los departamentos Castellanos y Las Colonias de la provincia de Santa Fe. Estudio preliminar.

Beck, A.<sup>1</sup>; Ferreira, M.<sup>2</sup>; Verna, A.<sup>3</sup>; Knowles, D.<sup>4</sup>; Gollán, A.<sup>5</sup>; Thompson, C.<sup>2</sup>; Odeón, A.<sup>3</sup>; Echaide, I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. Vet. Microbiol. Pathol., School Global Anim. Hlth., WSU, Pullman, Washington 99164. <sup>2</sup>INTA, EEA Rafaela. Ruta 34 km 227, 2300 Rafaela, Sta Fe. <sup>3</sup>INTA, EEA Balcarce. Ruta 6 Km 230. Balcarce, Buenos Aires. <sup>4</sup>Animal Diseases Research Unit, ARS, USDA, Pullman, Washington 99164. <sup>5</sup>Virología. FCV. Esperanza. Santa Fe. Correo-e: [echaide.ignacio@inta.gob.ar](mailto:echaide.ignacio@inta.gob.ar)

#### Introducción

El herpesvirus bovino 4 (BoHV-4), ha sido aislado de bovinos con diferentes patologías en vías respiratorias y tracto reproductivo. En este último asociado a endometritis, vaginitis y abortos. Sin embargo este herpesvirus gamma, perteneciente al género *Rhadinovirus* y sin relación genética cercana con otros virus herpes de la familia *Bovidae*, también ha sido aislado de bovinos clínicamente sanos. Los escasos eventos clínicos en los que se pudo comprobar su acción patógena directa, sugieren que con mayor frecuencia facilitaría el efecto de infecciones secundarias. En forma similar a otros virus herpes persiste en forma latente después de infecciones naturales y experimentales. La latencia se produce en células linfoides mononucleares y la reactivación es inducida por factores estresantes. En los bovinos portadores se mantienen niveles detectables de anticuerpos específicos no neutralizantes, que no impiden las re-infecciones. En Argentina el BoHV-4 ha sido aislado de mucus cérvico-vaginal (MCV) de vacas que habían abortado, de mucosa nasal, leucocitos, semen y ovocitos. Los objetivos de este proyecto son i) determinar la prevalencia en BoHV-4 en algunos rodeos lecheros de la cuenca lechera central en la provincia de Santa Fe, e intentar el aislamiento de cepas *in vitro*, y ii) caracterizar las cepas aisladas mediante el análisis de su comportamiento biológico y su perfil molecular. En este trabajo se presenta información preliminar del primer objetivo.

#### Materiales y métodos

Se seleccionaron 18 rodeos de bovinos Holando Argentino de los Dptos. Castellanos y Las Colonias de la provincia de Santa Fe. De cada rodeo se obtuvieron entre 17 y 30 muestras de sangre con y sin anticoagulante (n=476), de vacas que estaban en el último tercio de gestación. Para ello se obtuvo la colaboración de los Médicos Veterinarios, asesores de estos rodeos. Se obtuvieron los antecedentes reproductivos de cada vaca muestreada.

Todas las muestras de suero se analizaron mediante un ELISA comercial siguiendo el protocolo recomendado (Bio K 312, Bio X Diagnostics, Bélgica).

El ADN extraído de alícuotas de leucocitos de cada animal (n=382) fue sometido a una *nested*-PCR utilizando los *primers* externos BoHV4-F GTTGGGCGTCTGTATGGTAGC y BoHV4-R ATGTATGCCAAAACCTATAATATGACCAG, e internos BoHV4-F TTGATAGTGCCTTGTGGGATGTGGT y BoHV4-R CACTGCCCGGTGGGAAATAGCA. Después del parto se obtuvieron muestras de contenido uterino de un número variable de vacas de cada rodeo. Estas muestras se tomaron de la cavidad uterina utilizando pipetas de Cassou después de higienizar la región perineal. El mucus se descargó en tubos con el medio comercial MEM (Gibco; *Life Technologies*) con el agregado de antibióticos. Las muestras se transportaron refrigeradas y se almacenaron congelados a -70°C después de dividir las en dos alícuotas. Se procesaron mediante nPCR sólo 67 muestras de MCV, pertenecientes de 7 rodeos, y de estas 50 fueron cultivadas en células MDBK en el medio MEM con antibióticos.

#### Resultados

La prevalencia serológica de BoHV-4 en el total de bovinos analizados fue de 63,4% (n=302) y en todos los rodeos hubo al menos 1 vaca reproductora. Se pudieron amplificar secuencias del BoHV-4 en el 42,4% de las muestras de sangre analizadas mediante nPCR (n =145). Los rodeos fueron agrupados en 3

niveles de acuerdo a la prevalencia serológica y la proporción de muestras positivas a n-PCR (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de los rodeos lecheros de acuerdo a la prevalencia serológica de BoHV-4 (ELISA) y la proporción de vacas infectadas (n-PCR) en los departamentos Castellanos y Las Colonias (Santa Fe).

Prevalencia	Rodeos (n)	% Positivos ELISA (Media±DE)	% Positivos nPCR* (Media±DE)
Alta	6	86±60	54±10
Moderada	7	67±70	39±10
Baja	5	23±13	11±11

\*Leucocitos.

En 9 de 67 (13%) muestras de MCV, se amplificó un fragmento específico de BoHV-4. A su vez se lograron aislamientos de 4 muestras pertenecientes a un mismo rodeo. Las vacas de las que se obtuvieron esas muestras no tenían antecedentes de patologías reproductivas. De estas, dos fueron ELISA positivo y dos ELISA negativo. A su vez de cada uno de estos pares, sólo se pudo amplificar un fragmento específico mediante nPCR de la sangre de una de las vacas. El 58% de las vacas analizadas en este rodeo fue nPCR positivo en MCV. El resto de rodeos (6) analizados hasta el momento, fueron nPCR negativos excepto uno que fue MCV positivo en el 18%. Cuando se compararon los intervalos entre partos el promedio de las vacas con aislamiento fue de 476 días y el de las 26 vacas restantes, 390 días.

#### Discusión y conclusiones

El rol del virus BoHV-4 como causa primaria de desórdenes reproductivos aún no se ha dilucidado. En Argentina el virus ha sido aislado de vacas que habían abortado y fue identificado el ADN viral en leucocitos en del 63,4% de vacas lecheras de un rodeo con problemas reproductivos. En el presente estudio el virus fue aislado del mucus cérvico-vaginal de 4 vacas de un mismo rodeo. Ninguna de las vacas tenía antecedentes de endometritis ni de otros desórdenes reproductivos, y los partos fueron normales, sin embargo hubo mayor tiempo promedio parto-parto, que el resto de las vacas analizadas. Interesantemente en este rodeo, el 58% de las vacas eliminaba el virus en el MCV, contrastando con las vacas de los 6 rodeos restantes. La detección de reactores seropositivos al virus BoHV-4 observada en todos los rodeos analizados y la elevada seroprevalencia de la mayoría de los rodeos indican la endemidad de este virus en la cuenca lechera santafecina.

#### Bibliografía

Pérez, S.; Verna, A.; Leunda, M.; Favier,.; Ceriani, M.; Morán, P.; Odeón, A.; Esteban, E. (2011). Occurrence of bovine herpesvirus type 4 DNA in Argentinean Holstein cattle from Santiago del Estero, Argentina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 48:454-463.

Verna, A.E.; Manrique, J.M.; Pérez, S.E.; Leunda, M.R.; Pereyra, S.B.; Jones, L.R.; Odeón, A.C. (2012). Genomic analysis of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) from Argentina: High genetic variability and novel phylogenetic groups. *Vet. Microbiol.* 160:1-8.



## OTROS TRABAJOS QUE PARTICIPARON EN LA PRESELECCION

### DIAGNÓSTICO DE TRICHOMONOSIS VENÉREA BOVINA: CULTIVO EN MEDIO SEMISÓLIDO vs PCR

SOTO P.; FORLETTI A.; LUCCHESI E.E.

BIOTANDIL (Laboratorio Biológico de Tandil SRL). Montiel 834, Tandil. biotandil@biotandil.com.ar

#### INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de la Trichomonosis venérea bovina (TVB) requiere confirmar la presencia del *Trichomonas foetus* (*T. foetus*) en muestras clínicas mediante técnicas de laboratorio. El cultivo con aislamiento de dicho protozoario es el método más utilizado, siendo las muestras prepuciales, por la condición de portador del toro, las que más se examinan. Recientemente se ha discutido la especificidad de esta práctica, en virtud del crecimiento de otros protozoarios diferentes en el medio de cultivo y se ha recomendado utilizar la técnica de PCR para estos diagnósticos. La presencia de estos protozoarios intestinales se correlaciona con muestras clínicas contaminadas con materia fecal, favorecido por el uso de medios de cultivo líquidos con escasa inhibición de la flora contaminante, que está mezclada en el caldo.

El hallazgo de otros parásitos en las muestras ingresadas para diagnóstico de TVB fue descrito por Morgan en 1944, quien advirtió sobre esa circunstancia informando más de ocho géneros de protozoos diferentes. Dicho autor, cita el fenómeno de migración del *T. foetus*, tanto radial como hacia el fondo de un tubo de 20 cm. Otros autores, entre ellos Brodie, posteriormente recomendaron inocular solo la parte superior del medio de cultivo semisólido para retener allí la muestra clínica compuesta por esmegma prepucial, detritus celulares, bacterias, hongos y levaduras, migrando solo las trichomonas al fondo del tubo. Este crecimiento del parásito en el fondo del tubo puede supervisarse macroscópicamente y microscópicamente. Otro aspecto clave del diagnóstico está referido a la muestra, su obtención y transporte, donde la sobrevivencia del parásito en soluciones salinas puede ser exigua. El método e instrumento para obtener las muestras, deben ser elegidos cuidadosamente, en concordancia con el método de laboratorio, ya que esto influye directamente en la sensibilidad y especificidad del diagnóstico.

Conociendo estos fenómenos, nuestro laboratorio obtiene las muestras de campo directamente en medios de cultivo semisólido en tubo de hemólisis, que con su identificación original, son incubados y examinados por microscopía directa del fondo del tubo cerrado, asegurando así no solo un transporte eventualmente prolongado, sino también la trazabilidad de la muestra. Rutinariamente, en aquellos casos menos frecuentes, donde el protozoario no ofrece las características de curva de crecimiento y morfología características del *T. foetus*, se replica el aislamiento a un nuevo medio virgen y se le realizan coloraciones, habitualmente mediante T15. Tanto el desarrollo obtenido como la morfología y componentes estructurales observados, permiten el diagnóstico.

Teniendo disponible la técnica de PCR, durante el período abarcado por este ensayo, el total de muestras diagnósticas consideradas positivas por cultivo, fue sometido a la prueba de PCR con el propósito de comparar los resultados y confirmar la presencia del *T. foetus* en los cultivos.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo, se procesaron 9.000 muestras prepuciales, extraídas por Veterinarios clínicos mediante raspaje prepucial y sembradas a campo en el medio semisólido, de transporte y cultivo, TRICHOBIOOL provisto por BIOTANDIL, sin sobrepasar la primera mitad de la columna del medio fraccionado en tubo de hemólisis. Posteriormente, en el laboratorio, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 7 días con observaciones microscópicas cada 24 h, a través del fondo del tubo para la detección de protozoarios (metodología descrita por Lucchesi y Soto, 1988). De la totalidad de las muestras procesadas, se informaron 63 positivas a *T. foetus* aplicando criterios establecidos en la rutina de la observación microscópica.

Confirmación por PCR: Para la extracción de ADN se tomó 0,5 ml del fondo de cada tubo del aislamiento de campo, realizando dos lavados con PBS y centrifugados a 5.000 rpm 10 minutos. El pellet final fue resuspendido en agua destilada, incubado a 100°C y posteriormente tratado con proteinasa K.

Luego de centrifugar, el sobrenadante (ADN templado) fue conservado a -20°C en criotubos libres de nucleasas. Los primers utilizados fueron TFR1 y TFR2, común a toda la familia Trichomonadidae y TFR3 y TFR4 específicos para *T. foetus*. El protocolo de PCR fue realizado en un volumen final de reacción de 25 µl, conteniendo: buffer Taq 1x, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM, primer F 0.2 µM, primer R 0.2 µM, gelatina 0,01%, Taq 0.5U y 2,5 µl de ADN. La amplificación del ADN fue realizada con el siguiente programa: incubación inicial de 3 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C 30s, annealing a 65°C 30s y extensión a 72°C 60s. La amplificación fue concluida con una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,27% a 75V, coloreados con GelGreen y observados con transiluminador azul.

#### RESULTADOS

Los criterios para informar una muestra positiva fueron: a) Por observación microscópica del tubo a X100, con presencia de protozoarios con morfología y movimientos característicos de *T. foetus* y dinámica del crecimiento a partir del fondo del tubo. b) Por observación microscópica a X1000 en portaobjetos con Tinción15, de morfología, características estructurales de membrana ondulante, flagelos axostilo y núcleo. Las 63 muestras identificadas como positivas fueron detectadas entre las 24 y 72 h de incubación por observación microscópica del fondo del tubo. De los 63 primo cultivos, solamente 4 requirieron observación con Tinción15, por su movilidad y morfología dudosa a X100. Dos de estas cuatro muestras presentaron formas de pseudoquistes.

Los resultados de PCR, confirmaron que el total de 63 muestras informadas como positivas, correspondían a *T. foetus*, expresando las bandas específicas para TFR1-TFR2 y TFR3-TFR4.

#### DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, demuestran que el método de diagnóstico de la Trichomonosis por cultivo en medio semisólido, con una formulación adecuada para el metabolismo del *T. foetus* y con criterio microbiológico ofrece resultados confiables. Esta práctica utilizada en Argentina durante varias décadas y mejorada en concordancia con el avance del conocimiento, ha permitido bajar las tasas de rodeos infectados de más del 30 %, a un dígito para algunas regiones. Actualmente la PCR, se presenta como una herramienta molecular que permite confirmar el diagnóstico a través de marcadores genéticos específicos. No obstante, nuestra técnica de cultivo y reconocimiento del *T. foetus*, se ha mostrado tan útil como la PCR para el diagnóstico de la Trichomonosis venérea bovina.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Brodie ,O. 1970. Trichomoniasis, en Bovine Medicine and Surgery. Am. Vet. Pubbl. Inc.Illinois.
2. Campero, C.M.; Rodriguez Dubra, C.; Bolondi, A.; Cacciato, C.; Cobo, E.; Perez, S.; Odeon, A.; Cipolla, A.; BnDurant, R.H. 2003. Two step (culture and PCR) diagnostic approach for differentiation of non-*T. foetus* trichomonads from genitalia of virgin beef bulls in Argentina. Vet. Parasitol., 112(3):167-175.
3. Felleisen, R.S. 1997. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. Parasitology, 115:111-119
4. Lucchesi E.E. 1974. Técnica del culot en tubo de hemólisis para el diagnóstico de Tricomoniiasis con observación microscópica. Actas 1ª Jornada Veterinaria del Circulo Veterinario de Tandil.
5. Lucchesi, E.E.; Soto, P. 1988. Método para aislamiento de *Trichomonas foetus* en grandes rodeos de toros, con análisis microscópico del culot en tubo de hemólisis. IV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Vol. 1.
6. Morgan B. 1944. Bovine Trichomoniasis. University of Michigan Libraries. Burges Publish.

## ACTIVIDAD METABÓLICA Y SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *CAMPYLOBACTER FETUS*

L. Chiapparrone<sup>1,2</sup>, H. Echevarría<sup>2</sup>, C. Morsella<sup>3</sup>, C. Cacciato<sup>2,4</sup>, F. Paolicchi<sup>3</sup>, P. Soto<sup>2</sup>, M. Catena<sup>2</sup>

1 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. 2 Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental. NACT. SAMP. Unidad Ejecutora de CONICET (CIVETAN). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 3 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. EEA Balcarce. Departamento de Producción Animal. Laboratorio de Bacteriología. 4 Comisión de Investigaciones Científicas. [mlchiapp@vet.unicen.edu.ar](mailto:mlchiapp@vet.unicen.edu.ar)

**Introducción.** *Campylobacter* es un género bacteriano perteneciente a la familia *Campylobacteraceae* que incluye bacilos en forma de coma, gaviota o "S" y móviles por la presencia de uno o dos flagelos polares. Miden entre 0,5 y 5 micras de largo por 0,2 a 0,5 micras de ancho. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25 y 42 °C en condiciones de microaerofilia (85% N, 10% CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>) y reaccionan positivamente a la oxidasa y a la catalasa. La especie *Campylobacter fetus* (*C. fetus*) con sus dos subespecies *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (*Cfv*) y *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* (*Cff*), causa la campilobacteriosis genital bovina, una de las enfermedades reproductivas de mayor importancia en nuestro país, estimándose una prevalencia del 24% en la provincia de Buenos Aires. Es una enfermedad de transmisión venérea que se caracteriza por producir pérdidas en la gestación temprana y abortos ocasionales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de cepas de *C. fetus* aisladas en la provincia de Buenos Aires frente a diferentes pruebas metabólicas y agentes antimicrobianos.

**Materiales y Métodos.** Se utilizaron 73 cepas indígenas de *C. fetus* aisladas de muestras de bovinos entre los años 1997 y 2014: muestras de esmegma prepucial (n=10), de mucus cérvico vaginal (n=20) y de fetos (n=43), provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNCPBA) y del Laboratorio de Bacteriología (EEA-INTA Balcarce). Las cepas fueron conservadas en nitrógeno líquido como primoaislamientos para su caracterización. Las subespecies de *C. fetus* fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas convencionales: prueba de la catalasa y de la oxidasa, reducción de nitratos, producción de grupos sulfhidrilos en medio TSI, producción de sulfhidrilos en tiras de acetato de plomo en medio con cisteína, crecimiento en cloruro de sodio al 3,5% y tolerancia a la glicina al 1%. Del total de las cepas se caracterizaron como *Cfv* 38 (52 %) y como *Cff* 35 cepas (48%). Posteriormente, se evaluó el comportamiento de las cepas con pruebas no convencionales y repetición de pruebas convencionales con diferente componente activo al empleado en las pruebas de rutina: ureasa (URE), reducción de nitratos con nitrato potásico como componente activo (NIT), esterasa (EST), hidrólisis del hipurato (HIP), gamma glutamil transferasa (GGT), reducción del cloruro de trifenil-tetrazolio (TTC), pirrolidónil arilamidasa (PyrA), L-arginina arilamidasa (ArgA) y L-aspartato arilamidasa (AspA), fosfatasa alcalina (PAL), producción de sulfhidrilos con tiosulfato sódico como componente activo (H<sub>2</sub>S), asimilación de glucosa con D-glucosa (GLU), asimilación del succinato sódico (SUT), del acetato sódico (ACE), del propionato (PROP), del ácido málico (MLT) y del citrato trisódico (CIT) e inhibición del crecimiento en presencia de ácido nalidixico (NAL), cefazolina sódica (CFZ) y sensibilidad a la eritromicina (ERO). **Resultados.** El 100% de las cepas fueron positivas a la prueba de SUT y negativas a las pruebas de URE, HIP, GGT, PyrA, S<sub>2</sub>H, GLU, CIT, CFZ, PROP y ERO. Setenta y dos cepas (98,6%) fueron negativas a las pruebas de EST, AspA, PAL y MLT. Para la prueba de ArgA, 71 cepas (97%) fueron negativas. Dos cepas (2,7%) aisladas de fetos de distintas localidades, fueron positivas a ACE. La cepa N° 10.05 aislada de un feto en la localidad de Tandil en el año 2005 e identificada por pruebas bioquímicas tradicionales como *Cff*, por pruebas no tradicionales fue positiva a las pruebas de NIT, EST, TTC, ArgA, AspA, PAL, SUT, NAL, ACE y MLT e identificada como *C. sputorum* biovar *faecalis*. Debido a la variabilidad observada en los resultados, las pruebas de NIT, TTC y NAL se muestran en la siguiente tabla, discriminados por subespecie bacteriana y muestras clínicas de origen:

		Reducción de nitratos (NIT)							
		Positivo				Negativo			
		n	T	M	F	n	T	M	F
<i>Cff</i>		25	3	7	15	10	0	5	5
<i>Cfv</i>		29	6	7	16	9	1	1	7

		Reducción del cloruro de trifenil-tetrazolio (TTC)							
		n	T	M	F	n	T	M	F
<i>Cff</i>		11	2	4	5	24	1	8	15
<i>Cfv</i>		16	2	5	9	22	5	3	14

		Inhibición del crecimiento en presencia de ácido nalidixico (NAL)							
		n	T	M	F	n	T	M	F
<i>Cff</i>		7	2	2	3	28	1	10	17
<i>Cfv</i>		26	0	1	1	36	7	7	22

**Tabla 1.** Referencias: *Cff*: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; *Cfv*: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; n: cantidad de cepas; T: cepas aisladas de esmegma prepucial; M: cepas aisladas de mucus cérvico vaginal; F: cepas aisladas de fetos abortados.

**Discusión.** Los resultados demostraron que existe escasa variabilidad en el comportamiento bioquímico de las cepas, independientemente de su subespecie bacteriana y origen. Los resultados obtenidos por las pruebas de URE e HIP, coinciden con la bibliografía que cita un 100% de cepas negativas a ambas reacciones. Con respecto a NIT, el porcentaje de cepas de *Cfv* y *Cff* positivas (39,7 y 34,2%, respectivamente) es sensiblemente menor al informado por los autores, donde se estima que entre el 60-93% de *Cfv* y el 100% de *Cff* serían positivas. Si bien *C. fetus* oxida el citrato, succinato, fumarato, malato y oxalacetato, sólo se obtuvieron resultados positivos para el succinato sódico, el acetato sódico, ácido málico y citrato trisódico. Los resultados de las pruebas de URE, HIP, GGT, PyrA H<sub>2</sub>S, GLU, PROP, CIT, CFZ y ERO, fueron determinantes en la definición de la especie y subespecie bacteriana, mientras que los resultados de NIT y TTC fueron variables para *Cfv* y *Cff*. Se registró un bajo número de cepas resistentes a antibióticos. Las pruebas bioquímicas no convencionales permitieron la identificación de la cepa N° 10.05 como *C. sputorum* biovar *faecalis*, obteniendo resultados coincidentes con lo descrito para esta especie. **Bibliografía.** Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T. (2005). Págs. 1145-1160. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volumen two. Editorial Board. James T. Staley, *Chairman*, David R. Boone, *Vice Chairman*, Don J. Brenner, Paul De Vos, George M. Garrity, Michael Goodfellow, Noel R. Krieg, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer; Campero, C.M. (2002). Pérdidas ocasionadas por las enfermedades venéreas de los bovinos. *Revista Idia*. Vol. 21. N° 2. 127-131; Clark, B.L. (1971). Revisión de la *Vibriosis Bovina*. *Australian Veterinary Journal*. Vol. 47. 103-107; Penner, J.L. (1988). The Genus *Campylobacter*: a Decade of Progress. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 1. N° 2. 15

