e-book ISBN: 978-987-688-310-8

ASOCIACIÓN ARGENTINA
DE VETERINARIOS DE LABORATORIOS
DE DIAGNÓSTICO

XXII Reunión Científico Técnica

Carmen Maffrand, Anabela Benzoni y Gabriel Magnano

Coordinadores

Actas

15, 16 y 17 de noviembre de 2018

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

UniRío editora

Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico

XXII Reunión Científico Técnica

Resúmenes

Carmen Maffrand
Anabela Benzoni
Gabriel Magnano
(Coordinadores)

Universidad Nacional de Río Cuarto
Río Cuarto – Córdoba - Argentina

Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico : XXII Reunión Científica Técnica : resúmenes / Diego Fernando Eiras ... [et al.] ; coordinación general de Carmen Maffrand ; Anabela Benzoni ; Gabriel Gustavo Magnano. - 1a ed . - Río Cuarto : UniRío Editora, 2018.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-688-310-8

1. Medicina Veterinaria. 2. Diagnostico de laboratorio . 3. Actas de Congresos. I. Eiras, Diego Fernando II. Maffrand, Carmen, coord. III. Benzoni, Anabela, coord. IV. Magnano, Gabriel Gustavo, coord.
CDD 636.089

Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diágnostico. XXII Reunión Científica Técnica Resúmenes
Carmen Maffrand, Anabela Benzoni y Gabriel Magnano *(Coordinadores)*

2018 © by UniRío editora. Universidad Nacional de Río Cuarto
Ruta Nacional 36 km 601 – (X5804) Río Cuarto – Argentina
Tel: 54 (358) 467 6309. editorial@rec.unrc.edu.ar. www.unirioeditora.com.ar

Primera Edición: *noviembre de 2018*

ISBN 978-987-688-310-8

Este obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 2.5 Argentina.
http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/ar/deed.es_AR

Uni. Tres primeras letras de "Universidad". Uso popular muy nuestro; la Uni.
Universidad del latín "universitas" (personas dedicadas al ocio del saber),
se contextualiza para nosotros en nuestro anclaje territorial y en la concepción
de conocimientos y saberes construidos y compartidos socialmente.
El río. Celeste y Naranja. El agua y la arena de nuestro Río Cuarto
en constante confluencia y devenir.
La gota. El acento y el impacto visual: agua en un movimiento
de vuelo libre de un "nosotros".
Conocimiento que circula y calma la sed.

Consejo Editorial

Facultad de Agronomía y Veterinaria
Prof. Laura Ugnia y Prof. Mercedes Ibañez

Facultad de Ciencias Económicas
Prof. Nancy Scattolini y Prof. Silvia Cabrera

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Prof. Sandra Miskoski

Facultad de Ciencias Humanas
Prof. Gabriel Carini

Facultad de Ingeniería
Prof. Marcelo Alcoba

Biblioteca Central Juan Filloy
Bibl. Claudia Rodríguez y Prof. Mónica Torreta

Secretaría Académica
Prof. Ana Vogliotti y Prof. José Di Marco

Equipo Editorial

Secretaria Académica: *Ana Vogliotti*
Director: *José Di Marco*
Equipo: *José Luis Ammann, Daila Prado, Maximiliano Brito, Ana Carolina Savino, Soledad Zanatta, Lara Oviedo, Roberto Guardia y Daniel Ferniot*

XXII REUNIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA DE LA 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)

14, 15, 16 Y 17 DE NOVIEMBRE

RÍO CUARTO – CÓRDOBA

2018

COMISIÓN DIRECTIVA (2016-2018)

PRESIDENTE:

Dra. Carmen Maffrand.
(Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC y Laboratorios Maffrand).

VICEPRESIDENTE:

Dra. Nirma Alicia Gonzalez.
(Laboratorio Regional SENASA Santa Fe).

SECRETARIO:

Dra. Anabela Benzoni.
(Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC).

TESORERO:

Dra. Elvira Falzoni.
(Universidad de Buenos Aires).

VOCALES

Dr. Gabriel Gustavo Magnano.
(Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC)
Dr. Diego Eiras.
(Facultad Ciencias Veterinarias, UNLP y Laboratorio DIAP).
Dr. Luis Samartino.
(Instituto de Patobiología. Centro de Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA)-INTA).
Dra. María Andrea Fiorentino.
(Laboratorio de Bacteriología, Grupo de Sanidad Animal. INTA, EEA Balcarce).

VOCALES SUPLENTES

Dra. Guillermina Dominici.
(Laboratorio privado. Rio Cuarto).
Dra. Ana Canal.
(Universidad Nacional del Litoral)
Dr. Carlos Robles.
(Grupo Salud Animal. INTA. Bariloche).
Dr. Gustavo Combessies.
(Laboratorios Azul).

REVISORES DE CUENTA

Dra. Patricia Laura Llorente.
(Ex Facultad de Cs. Veterinarias, UBA).
Dra. María Graciela Draghi.
(Ex integrante INTA Mercedes, Corrientes).

REVISORES DE CUENTA SUPLENTES

Dr. Carlos Rossanigo.
(Laboratorio de Salud Animal. INTA Villa Mercedes, San Luis).
Dra. Marcela Martinez Vivot
(Universidad de Buenos Aires).

COMITÉ REVISOR

Dr. Carlos Robles

Dra. Patricia Llorente

Dr. Carlos Rossanigo

Dra. Graciela Draghi

Dr. Ernesto Spath

Dra. Elvira Falzoni

Dra. María José Dus Santos

Dra. Sandra Arauz

Lic. María Lucía Coria

Dra. Susana Torioni

Dra. Carmen Maffrand

AGRADECEMOS A NUESTROS PATROCINANTES QUIENES CON SU AUSPICIO HICIERON POSIBLE LA REALIZACIÓN DE ESTA REUNIÓN

UNRC CREER...CREAR...CRECER	IMMUNOLOGY REACTIVOS PARA DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN VETERINARIA
Ministerio de CIENCIA Y TECNOLOGÍA · GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA · ENTRE TODOS	COLEGIO MÉDICO VETERINARIO DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA
INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria	Laboratorio® Biológico de Tandil
BIOARTIS®	Laboratorios Maffrand
Laboratorio Azul Diagnóstico S.A.	CONRADO LIBROS

POR LOS ANIMALES. POR LA SALUD. POR USTED.
zoetis

DiAP
Diagnóstico veterinario al servicio de profesionales y laboratorios veterinarios
www.diap.com.ar

Laboratorio Mesopotámico
de Diagnóstico Veterinario
Ramirez 72 - Concordia - Entre Ríos
Tel 0345 - 4213294 / 4210516
Email: laboratorio@labmesopotamico.com.ar
carlosbocero50@gmail.com
www.labmesopotamico.com.ar

Laboratorio Veterinario
JDA
Dr. José Darío Alvarez
"alguien en quien confiar"
José M. Rolón (ex Vera) 2029-Corrientes- Argentina
Tel/Fax: 0379-4429001
laboratoriojda@gmail.com / www. Labvetneajda.com.ar

LA CESIRA Vet

LABORATORIO DE SALUD ANIMAL
JUAN B. JUSTO 269
5800 - Río Cuarto - Cba
Tel: 0358-4639019
Fax: 0358-4625012
Email:
laboratoriodesaludanimal@gmail.com

NUEVO
LABORATORIO LAVER
LABORATORIO VETERINARIO DE ENFERMEDADES DE LA REPRODUCCIÓN

VASQUETTO
NUTRICION ANIMAL

LLAMAS®
LABORATORIOS Y SERVICIOS

759
Qr4
QUIMICA
RÍO CUARTO
(0358)
464-6405
Carlos Goudard 759
Río Cuarto, Cba.
quimicario4@gmail.com
www.quimicariocuarto.com.ar
Química Río Cuarto
División Pilatas
Química Río Cuarto
División Artística
Química Río Cuarto

teknal
Nutrición Animal

URANI BIOMEDICA
Tecnología y Servicios para la Salud

EDITORIAL

Hemos transcurrido dos años de gestión, donde nuestro principal objetivo fue brindar a los integrantes de esta asociación, la mayor información tendiente a fortalecer la formación científica y tecnológica, a través de cursos, manuales y una fluida comunicación por intermedio de nuestro correo electrónico y página web. Otro objetivo planteado fue tratar de reactivar comisiones científicas consideradas de suma importancia para la vida institucional. Creemos que queda mucho por hacer, pero nos queda la tranquilidad de haber puesto nuestro granito de arena, con esfuerzo y dedicación, trabajando en este sentido.

Hoy nos encontramos a la puerta de concretarse nuestra XXII Reunión Científica y Técnica de la AAVLD, que tiene como sede a la ciudad de Río Cuarto, provincia de Córdoba y ante esta realidad, haremos algunas reflexiones que consideramos importantes.

Queremos realizar un profundo agradecimiento a todos los disertantes, por su inmediato e incondicional apoyo a esta Reunión, ya que, sin esta predisposición no hubiese sido posible llevar adelante un encuentro con tantos especialistas de excelente nivel.

Debemos resaltar el trabajo de las Comisiones Científicas, que son el principal nutriente de la Asociación, enriqueciendo permanentemente con sus aportes los conocimientos en cuanto a los criterios diagnósticos, aplicación de nuevas tecnologías y controles de calidad para dar mayor confianza a los resultados de laboratorio.

También agradecer a las empresas que con su patrocinio, nos permitieron hacerle frente a las grandes diferencias sufridas en nuestros presupuestos.

Un reconocimiento especial para todos los autores y evaluadores, que componen una base enorme de investigadores y trabajadores, quienes permanentemente apuntan a mantener en alto el nivel científico tecnológico de nuestra institución y que son los verdaderos protagonistas de este libro de resúmenes.

Por último un agradecimiento a la Comisión Directiva de la AAVLD, por su trabajo silencioso y su apoyo a todas las propuestas realizadas y extender nuestra gratitud a todas aquellas personas que nos acompañaron desinteresadamente durante este período.

Carmen I.Maffrand
Presidente

RESÚMENES DE CONFERENCIAS

INTRODUCCIÓN A LOS GÉNEROS *Hepatozoon, Babesia, Rangelia, Leishmania* y *Dirofilaria* EN PERROS

Diego F. Eiras
Laboratorio de Inmunoparasitología, Departamento de Epizootiología y Salud Pública, FCV, UNLP, 60 y 118, La Plata, Buenos Aires, Argentina. Laboratorio DIAP (Diagnóstico en Animales Pequeños), Pueyrredón 1098, Banfield, Buenos Aires, Argentina.
e-mail: diegoeiras@diap.com.ar

En general nos referimos a las "enfermedades transmitidas por vectores en perros" (siglas en inglés CVBDs: *canine vector borne diseases*) cuando hablamos de aquellas afecciones sistémicas con características clínico-patológicas similares que afectan la sangre y otros órganos y tejidos hemolinfáticos, producidas por diversos patógenos de transmisión vectorial. Estos patógenos son transmitidos de distintas maneras por una amplia variedad de artrópodos hematófagos (garrapatas, vinchucas, mosquitos, flebótomos, pulgas, etc.), mediante la picadura, la ingestión o las deyecciones del vector competente. Existen múltiples factores relacionados, entre otras cosas, con el cambio climático y el impacto humano sobre los ecosistemas, que amplifican las oportunidades de aparición de estas enfermedades en zonas anteriormente libres. En lo que sigue se reseñan algunas de las CVBDs presentes en nuestro país y los agentes que las producen.

Hepatozoonosis canina: las dos especies del género *Hepatozoon* que infectan a los perros son *Hepatozoon canis* y *H. americanum*. En nuestro país, la única especie reportada hasta el momento es *H. canis.* Este coccidio extraintestinal produce en los perros una enfermedad sistémica moderada a grave. Es transmitido mediante la ingestión de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus.* La hepatozoonosis es considerada una enfermedad -aunque controlable- parasitológicamente incurable. El diagnóstico definitivo se realiza mediante la observación de gamontes en neutrófilos y monocitos en los extendidos de sangre coloreados. Es muy importante para el pronóstico contar con el nivel de parasitemia absoluta que tiene el paciente (calculada en base al porcentaje de células parasitadas respecto de la suma de neutrófilos y monocitos). Una parasitemia elevada (>800 gamontes/µl) se encuentra generalmente asociada a cuadros clínicos severos y de mal pronóstico respecto de aquellos con parasitemias bajas (<100 gamontes/µl) que cursan usualmente con escasa o nula manifestación. Los hallazgos clínico-patológicos asociados a la infección son anemia crónica no regenerativa y leucograma inflamatorio. Los perros que remiten clínicamente y consiguen eliminar la parasitemia deberían ser reevaluados hematológicamente durante la primavera y el verano o cuando se observen recaídas clínicas.

Piroplasmosis canina: enfermedad producida por especies de los géneros *Babesia, Theileria* y *Rangelia.* que se diagnostica usualmente mediante técnicas directas que demuestran la presencia de merozoítos intraeritrocitarios en extendidos sanguíneos coloreados. Este procedimiento permite identificar la parasitemia (expresada en porcentaje de glóbulos parasitados) y tiene un límite de detección de 0,001 a 0.0001%. El tamaño de los merozoítos permite la diferenciación entre piroplasmas "pequeños" (<2,5 µm) o "grandes" (>2,5 µm), pero no es posible definir la especie de piroplasma actuante usando microscopía óptica. En este sentido, el diagnóstico molecular ha permitido la identificación de varias especies de piroplasmas que afectan al perro en todo el mundo. En nuestro país, la piroplasmosis es producida por dos piroplasmas grandes: *Babesia vogeli* (reportada en Buenos Aires y Córdoba) y *Rangelia vitalii* (presente en las provincias de la Mesopotamia) y un piroplasma pequeño: *Babesia gibsoni* (recientemente caracterizado). La primera es transmitida por *R. sanguineus*; es una especie relativamente poco patógena que en muchas oportunidades no se presenta con manifestaciones clínico-patológicas de importancia. En algunos casos puede producir cuadros de anemia e insuficiencia renal, especialmente cuando el proceso está asociado a otras patologías o infecciones concomitantes. *Rangelia vitalii* es transmitida por *Amblyomma aureolatum*, produce una afección muy peculiar que se presenta clínicamente con sangrado espontáneo de las orejas (lo que le da el nombre de *Nambiuvú*: orejas sangrantes en guaraní). En el caso de *R. vitalii* los merozoítos también invaden los leucocitos y las células endoteliales. *Babesia gibsoni* es transmitida por *R. sanguineus* y además se encuentra descripta la transmisión horizontal a través de la mordedura entre perros de pelea. En general este piroplasma se presenta con cuadros de anemia moderada a grave y es más difícil de tratar que las dos especies anteriormente mencionadas.

Leishmaniosis canina: es una enfermedad transmitida por flebótomos producida por protozoarios del género *Leishmania*. En nuestro país, la principal especie es *Leishmania infantum*, transmitida por *Lutzomyia longipalpis*. Afecta al hombre y otros mamíferos, por lo que la OMS la considera una zoonosis de alto impacto mundial. Los perros son el principal reservorio doméstico de la infección y al mismo tiempo los más susceptibles de sufrir la enfermedad clínica. El diagnóstico representa un verdadero desafío veterinario debido a la compleja interacción entre el sistema inmune y el protozoo. Si hay manifestaciones clínicas, la respuesta es generalmente humoral y las técnicas serológicas resultan adecuadas. Si la respuesta es celular o el nivel de anticuerpos bajo, se necesita de una combinación de métodos (directos e indirectos) para obtener resultados confiables. Dentro del diagnóstico serológico, las pruebas cualitativas rápidas son de fácil utilización, pero se obtienen buenas concordancias cuando los títulos de anticuerpos son relativamente altos (160 o más) en pruebas cuantitativas como IFI o ELISA. La citología de médula ósea y otros órganos linfáticos resulta confirmatoria cuando se observan los parásitos en los macrófagos tisulares. El complemento de las técnicas de PCR también puede ser confirmatorio si se encuentran disponibles. Se recomienda que ningún método diagnóstico sea utilizado por si solo en la toma de decisiones clínicas o sanitarias.

Filariasis canina: producida en nuestro país principalmente por *Dirofilaria immitis.* Esta especie un nematode cardiopulmonar transmitido mediante la picadura de mosquitos de diversos géneros, siendo *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* las únicas especies detectadas como vectores hasta el momento. Se encuentra descripta en 11 provincias, desde el centro al norte del país. El diagnóstico se realiza de manera directa mediante el hallazgo de microfilarias en sangre periférica. Estas pueden evidenciarse mediante la observación de sangre anticoagulada en "gota gruesa" o en la interfase del capilar microhematocrito luego de la centrifugación o mediante la concentración de microfilarias por filtración o test de Knott modificado. La confirmación de especie (necesaria en ciertas regiones) puede realizarse mediante la demostración de la actividad de fosfatasa ácida en determinadas regiones del cuerpo de las microfilarias o mediante diagnóstico molecular. La infección por *D. immitis* también puede diagnosticarse utilizando pruebas inmunocromatográficas rápidas que demuestran la presencia del antígeno uterino sintetizado por las hembras adultas del parásito en el suero del paciente. Tanto los métodos directos como la inmunocromatografía carecen de la capacidad de detectar a todos los animales infectados. En consecuencia, algunos perros con sospecha de infección pueden necesitar ser sometidos a diferentes métodos complementarios de diagnóstico.

Hallazgos de laboratorio asociados a la infección por algunos patógenos transmitidos por vectores en perros de Argentina.

	B. vogeli	*R. vitalii*	*H. canis*	*L. infantum*	*D. immitis*
Anemia crónica	no	no	si	si	si
Anemia hemolítica	si	si	posible	no	posible
Leucocitosis	variable	-	si	posible	-
Leucopenia	variable	-	posible	posible	-
Trombocitopenia	posible	si	posible	posible	posible
Monocitos activados	si	si	si	si	no
Hiperproteinemia	no	-	si	si	variable
Hipoalbuminemia	variable	-	si	si	posible

Factores de riesgo de infección por patógenos transmitidos por vectores en perros de Argentina.

	B. vogeli	*R. vitalli*	*H. canis*	*L. infantum*	*D. immitis*
Edad	< 1 año	animales jóvenes	< 1 año	animales jóvenes	adultos
Raza	no	mestizos	mestizos	boxer, cocker	pelo corto/gran tamaño
Sexo	machos	machos	machos	machos	machos
Distribución	mundial	local	mundial	mundial	mundial
Transmisión vertical	posible	-	posible	si	no
Hábitos	-	-	-	fuera de la casa	fuera de la casa

Hallazgos clínicos asociados a la infección con algunos patógenos transmitidos por vectores en perros de Argentina.

	B. vogeli	*R. vitalii*	*H. canis*	*L. infantum*	*D. immitis*
Anorexia	si	posible	si	si	variable
Fiebre	si	si	si	si	no
Caquexia	si	si	si	si	si
Esplenomegalia	si	si	si	si	no
Linfadenopatía	no	si	si	si	no
Sangrado	posible	si	no	posible	posible
Enfermedades de piel	no	no	no	si	posible
Falla renal	posible	posible	posible	si	posible
Daño hepático	no	no	posible	si	posible
Ictericia	posible	posible	posible	posible	posible
Dolor muscular	no	no	posible	no	no
Eliminación farmacológica del patógeno	si	si	no	no	posible
Vector competente	garrapatas	garrapatas	garrapatas	flebótomos	mosquitos

EHRLICHIA, ANAPLASMA Y RICKETTSIA: DIAGNÓSTICO E IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA

Gabriel Leonardo Cicuttin.
Instituto de Zoonosis Luis Pasteur
gcicuttin@gmail.com

Las rickettsiosis, ehrlichiosis y anaplasmosis son enfermedades transmitidas por artrópodos que afectan a humanos y animales. La epidemiología depende de la ecología de los vectores y de los hospedadores amplificadores implicados, de la relación vector-hospedador y de la existencia de vectores y hospedadores secundarios. Presentan distribución mundial, con delimitaciones geográficas debida a los vectores (y a los hospedadores amplificadores). En algunas regiones son consideradas enfermedades emergentes y reemergentes, mostrando una relación estrecha con modificaciones humanas del ambiente; pero esta emergencia también debe ser considerada producto de una mayor capacidad de detección de dichos patógenos en el laboratorio por métodos moleculares.

El género *Rickettsia* (familia Rickettsiaceae, orden Rickettsiales, subdivisión Alpha-Proteobacterias) se clasifica en cuatro grupos: i) **grupo de las fiebres manchadas (GFM)**, transmitido principalmente por garrapatas ixódidas (garrapatas duras); ii) grupo de transición (que incluye a *Rickettsia felis* y *Rickettsia akari*, transmitidas por pulgas y ácaros respectivamente); iii) grupo tífico (*Rickettsia typhi* y *Rickettsia prowaseckii*), transmitidos por insectos (pulgas y piojos respectivamente); y iv) un grupo ancestral que incluye a *Rickettsia bellii* y *Rickettsia canadensis*, transmitido principalmente por garrapatas duras. Complementariamente, se debe incluir el grupo de especies de rickettsias endosimbiontes encontradas sólo en artrópodos y otros eucariotas.

Son bacterias pequeñas, con forma de cocobacilos pleomórficos, intracelulares obligadas y Gram-negativas (aunque se tiñen mal mediante esta tinción, utilizándose por ello la tinción de Giménez, Giemsa o naranja de acridina). Su cultivo se realiza en líneas celulares como Vero, HEL, L-929 o líneas celulares de artrópodos, animales de laboratorio o huevos embrionados. El blanco de las rickettsias en el hospedador vertebrado son las células endoteliales, produciendo vasculitis con un incremento en la permeabilidad vascular y edema.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la técnica de referencia para el diagnóstico serológico de las rickettsiosis. Se utilizan sueros pareados (con una separación de 2 a 4 semanas). El diagnóstico se confirma con un incremento de 4 veces o más del título de anticuerpos. La existencia de reacciones cruzadas entre especies de rickettsias (especialmente dentro de cada grupo), dificulta identificar a la especie causante de la enfermedad mediante técnicas serológicas.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método diagnóstico confirmatorio (aunque un resultado negativo no excluye la infección). Las muestras ideales proceden de las pápulas, máculas o de la escara de inoculación. Dado que la rickettsemia es baja y de corta duración, la sangre no es de utilidad para la PCR.

Los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* pertenecen a la familia Anaplasmataceae, orden Rickettsiales, subdivisión Alpha-Proteobacterias. Son bacterias pequeñas, Gram-negativas (aunque se tiñen mejor mediante tinción de Romanowsky), cocobacilos pleomórficos e intracelulares obligadas que forman a menudo inclusiones denominadas mórulas. Algunas especies se lograron aislar y cultivar en líneas celulares de células hematopoyéticas y de garrapatas. El blanco de las ehrlichias y anaplasmas en los hospedadores vertebrados son las células hematopoyéticas (maduras e inmaduras), incluyendo eritrocitos, células reticuloendoteliales, células fagocíticas derivadas de la médula ósea y células endoteliales.

El examen microscópico de frotis (de sangre periférica, linfonódulos, bazo o médula ósea) con tinción de Giemsa tiene una utilidad variable según el patógeno sospechado.

En las ehrlichiosis y anaplasmosis en caninos y humanos, la IFI es la técnica de referencia para el diagnóstico serológico. En humanos se utilizan sueros pareados, considerándose fuertemente sugestivo de enfermedad un sólo título mayor o igual a 1/256, seroconversión de negativo a positivo (mínimo 1/64) o un incremento de 4 veces o más del título de anticuerpos son fuertemente indicativos de enfermedad. En la ehrlichiosis monocítica canina, la detección de títulos mayores a 1/40 o 1/80 sugiere una infección pasada o presente. Para el diagnóstico de ehrlichiosis y anaplasmosis caninas también se utilizan métodos serológicos rápidos como inmunocromatografía o ELISA-*dot*. Algunos presentan múltiples antígenos (*E. canis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*). Los resultados de estos métodos son cualitativos, siendo de utilidad en la práctica clínica dada su sencillez, pero deberían ser utilizados en combinación con IFI o PCR para una confirmación diagnóstica precisa. Se debe tener en cuenta la existencia de reacciones cruzadas entre las especies de cada género, así como, en menor medida, entre especies de ambos géneros.

La PCR es un método diagnóstico confirmatorio (aunque un resultado negativo no excluye la infección). En humanos y caninos, dada la ocurrencia de falsos positivos y negativos en el examen microscópico, así como resultados inespecíficos mediante métodos serológicos, la PCR es la técnica de elección para confirmar la patología. La muestra puede ser sangre periférica, punción aspiración de médula ósea o linfonódulos y biopsias de tejidos como bazo, según el patógeno y la etapa de la enfermedad.

Los géneros *Rickettsia*, *Ehrlichia* y *Anaplasma* presentan una gran relevancia en salud pública, siendo agentes causales de diversas patologías en humanos a nivel mundial.

Los agentes causales de rickettsiosis humana (del grupo de las fiebres manchadas) en Argentina son *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* y *Rickettsia massiliae*.

Rickettsia rickettsii produce la rickettsiosis más grave del mundo, con alta letalidad sin tratamiento (casos fatales fueron reportados en Brasil, Argentina, Colombia, así como países de Centroamérica y Norteamérica). Dicho patógeno está presente sólo en América. Los signos clínicos más habituales son fiebre, náuseas, vómitos, dolores musculares, pérdida del apetito, dolor de cabeza, *rash* maculopapular, dolor abdominal y articular, y diarrea. En Argentina, la transmisión de *R. rickettsii* está asociada a garrapatas del complejo *Amblyomma cajennense* (*Amblyomma sculptum* y *Amblyomma tonelliae*, con distribución en el norte del país).

Rickettsia parkeri produce una enfermedad más leve con fiebre alta, cefalea, fotofobia, artromialgias, diarrea y sensación de malestar general, *rash* no prurítico predominantemente en extremidades (maculopapular, papulovesicular y petequial) y lesión necrótica en el sitio de la picadura de la garrapata (mancha negra, *tache noir*). Dicho patógeno está presente sólo en América. Es transmitida en Argentina por garrapatas de las especies *Amblyomma triste* (con distribución en áreas de humedales de la cuenca del Paraná) y *Amblyomma parkeri* (distribuida en el centro-norte del país).

Rickettsia massiliae se ha detectado en la región del mar Mediterráneo (Europa, África y Asia), EEUU y Argentina; produce una enfermedad similar a *R. parkeri*, En Argentina es transmitida por garrrapatas *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (con distribución en prácticamente todo el país, especialmente en áreas urbanas).

Los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* han sido menos estudiados desde un punto de vista de salud pública en Argentina. Se encontró seropositividad a *Ehrlichia* en humanos del norte del país y se ha sospechado la ocurrencia de un caso de ehrlichiosis en Córdoba. En garrapatas *A. tigrinum* y *Amblyomma parvum* se ha detectado una ehrlichia similar a *Ehrlichia chaffeensis* (agente causal de la ehrlichiosis monocítica humana). Por otra parte, en perros y en *R. sanguineus* sensu lato de distintas regiones de Argentina, se ha notificado la presencia de *Anaplasma platys* y *Ehrlichia canis*; dichos patógenos se consideran de bajo potencial zoonótico.

Desde un punto de vista de salud pública, las rickettsiosis (y posiblemente las ehrlichiosis y anaplasmosis) representan un grupo de enfermedades subdiagnosticadas en Argentina, que requieren una mayor concientización del equipo de salud, especialmente médicos y veterinarios, junto con una mayor disponibilidad del diagnóstico de laboratorio, para mejorar la confirmación de casos clínicos, así como prevenir estas enfermedades.

VECTORES DE EHRLICHIA Y ANAPLASMA EN ARGENTINA

Santiago Nava[1]
[1] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CC 22, 2300 Rafaela, Santa Fe, Argentina.
nava.santiago@inta.gob.ar

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos de reconocida importancia veterinaria y para la salud pública, ya que son vectores de microorganismos patógenos como protozoos, rickettsias, espiroquetas y virus que afectan tanto a los animales domésticos como al hombre, y debido a los efectos deletéreos del parasitismo per se al provocar toxicosis, parálisis, irritación y alergia a sus hospedadores. En la Argentina aproximadamente 15 especies de garrapatas parasitan frecuentemente animales domésticos como bovinos, equinos, caprinos y caninos, y al hombre.
Por lo tanto, estas garrapatas poseen la capacidad potencial para transmitir microrganismos patógenos de importancia sanitaria como por ejemplo Anaplasma y Ehrlichia. El género Anaplasma (Rickettsiales: Anaplasmataceae) incluye bacterias intracelulares de gran interés en el mundo por las severas pérdidas económicas que produce en los sistemas de producción de leche y carne. Existen diferentes especies del género Anaplasma que afectan a bovinos, ovinos, algunos rumiantes silvestres, equinos y aún al hombre. Hasta el momento en Argentina se conoce la presencia de Anaplasma marginale, el agente causal de la anaplasmosis de los bovinos, y Anaplasma platys, causante de la trombocitopenia cíclica infecciosa en perros. Tradicionalmente se ha implicado como vector de A. marginale a la garrapata común del bovino Rhipicephalus microplus, aunque su rol en la epidemiología de esta enfermedad no está fehacientemente establecido. También existe evidencia preliminar que vincula a garrapatas del género Amblyomma en la transmisión de A. marginale. Las bacterias del género Ehrlichia (Rickettsiales: Anaplasmataceae) son alfa-proteobacterias intracelulares obligadas, transmitidas por garrapatas, y agentes etiológicos de enfermedades que afectan a animales y seres humanos. Particularmente en la Argentina, solo se conocen con relativa profundidad aspectos de la epidemiología del agente causal de la ehrlichiosis canina, E. canis, la cual es transmitida por la garrapata Rhipicephalus sanguineus s.l. Los únicos datos adicionales a los existentes sobre E. canis se restringen a estudios en los cuales se detectó ADN ehrlichial en Amblyomma parvum y Amblyomma tigrinum, dos especies de garrapata endémicas con importancia veterinaria para la Argentina.
Los resultados de estos trabajos han demostrado que al menos dos cepas diferentes de Ehrlichia sp. (una de ellas cercana filogenéticamente a E. chaffeensis, agrente patógeno con relevancia médica y veterinaria) se encuentran circulando en áreas rurales y periurbanas de la Argentina. En esta presentación se discute el estado del conocimiento sobre el rol de las garrapatas en la transmisión de Ehrlichia y Anaplasma en Argentina.

"CASOS, PREVENCION Y CONTROL DE LA BRUCELOSIS CANINA Y SU IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA"

Cecilia Laura Di Lorenzo
Docente investigador . Profesora ordinaria de la Cátedra de Inmunología I parte. Carrera de Microbiología Clínica e Industrial. Directora del Laboratorio de Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

El avance de la ciencia, la generación de conocimiento y la reformulación de las distintas disciplinas científicas nos conducen a inferir que el concepto de "Salud Animal" al que habitualmente se refiere en medicina veterinaria, cuando nos enfrentamos a una enfermedad zoonótica como la brucelosis resulta parcial, e incompleto. No existe la "salud animal" como un hecho aislado, existe la Salud Pública.

La brucelosis canina representa un importante desafío en el área de la salud pública, no solo por su gran poder de transmisión y difusibilidad, sino por el cada vez mas estrecho contacto del perro y el hombre. Junto a una actividad comercial en constante aumento tal como los criaderos, de pequeña escala, de tipo domiciliario.

En el perro (Canis familiaris) se ha descrito la infección por cuatro de las seis biovariedades de Brucella.spp reconocidas: *Brucella abortus; Brucella suis* y *Brucella melitensis* , ademas de la infección por *Brucella canis.*

Los perros y otras especies de cánidos son los únicos huéspedes naturales de B. canis, sin existir predisposición por sexo, raza o edad. Esta enfermedad por su carácter crónico puede presentarse en forma a sintomática, carente de toda manifestación clínica aparente. Pudiéndose presentar en perros callejeros y con dueño.La ***Brucella canis*** es un coco bacilo, pleomorfico, Gram Negativo, con Lipopolisacarido (LPS) de tipo rugoso, de vida endocelular. La transmisión de la enfermedad puede realizarse mediante el contacto directo de un animal infectado con uno sano, sea por vía sexual, por vía oral , nasal o conjuntival , dado que la bacteria se encuentra tanto en el semen y las secreciones vaginales, como en la orina, leche y fetos abortados de los animales enfermos. La transmisión social ocasional es otra vía de contagio frecuente, que debe de considerarse, al momento de estudiar un caso, ya que el olfateo y lamido de los genitales es una forma de comunicación canina. Por ser una bacteria de tipo intra celular, la enfermedad pasa de un periodo agudo muy corto, caracterizado por fiebre, linfadenitis y orquitis-epididimitis en los machos y aborto en las hembras preñadas a un curso subgudo y crónico asintomático. El lugar de acantonamiento de las *brucellas* en el organismo esta representado mayoritariamente por los ganglios linfáticos, tomando un especial importancia los retroinguinales y retromamarios, ya que serán la fuente de migración hacia los órganos sexuales , durante el celo, ante una gestación, periodo de servicio, o el alcance de la madurez sexual en los cachorros infectados. Cabe resaltar que la vía congénita esta demostrada ampliamente para el género *Brucella* y la sobrevida de los cachorros infectados intrauterinamente, aunque débiles y de bajo peso, en los caninos resulta frecuente. En el macho afecta el testículo produciendo infertilidad, atrofia testicular, orquitis y epididimitis,uni o bi lateral , dermatitis escrotal y prostatitis. En las hembras gestantes, posee un acentuado tropismo por la placenta, disminuyendo el aporte de oxígeno al feto, teniendo como consecuencias desde la reabsorción embrionaria; si la muerte ocurre en el primer tercio de la gestación hasta el aborto prácticamente a término (50-55 días de gestación). No afecta el ciclo estral por lo tanto en las hembras no gestantes no hay manifestación clínica evidente. Y la ocurrencia de celos y posterior preñez no se verán afectadas. Existen otras presentaciones clínicas asociadas a la brucelosis canina que se manifiestan cuando se considera que la enfermedad esta en estado crónico, estos pueden ser: disco espondilitis, glomérulo nefritis, uveítis anterior, meningo encefalitis, prostatitis, lesiones en la piel, y atrofia testicular.

El ser humano se infecta con esta bacteria al convivir o tomar contacto con animales infectados, en este sentido cabe destacar el riesgo profesional que implica así como también señalar que existen registros de enfermedad en propietarios de animales infectados.

Los síntomas son usualmente indefinidos, identificados como un síndrome febril prolongado con aumento de tamaño de nódulos linfáticos.

En el desarrollo de esta intervención, se abordarán caos clínicos de infecciones naturales ,modelos de control en criaderos, infecciones de caninos urbanos con brucellas lisas, casuística de infecciones extragenitales, así como diagnósticos diferenciales requeridos en su secuencia diagnostica.

LEPTOSPIROSIS EN ANIMALES DE COMPAÑÍA

Bibiana Brihuega 1
1 Laboratorio de Leptospirosis, Instituto de Patobiología CICVyA-CNIA-INTA Castelar
Laboratorio Referencia OIE
brihuega.bibiana@inta.gob.ar

La leptospirosis afecta a los animales de producción, de compañía , silvestres y al hombre. La difusión de la enfermedad se produce sobretodo por la eliminación de leptospiras a través de la orina. Los animales considerados como los principales difusores de esta zoonosis son los caninos, porcinos y roedores.

El perro puede ser portador renal de leptospira. La bacteria ingresa al organismo a través de las mucosas o de abrasiones en la piel y se multiplica rápidamente una vez alcanzado el torrente sanguíneo. Posteriormente se disemina y replica adicionalmente en numerosos tejidos, incluyendo el riñón, el hígado, el bazo, el SNC, ojos y tracto genital. Si el animal sobrevive a la infección, la respuesta inmune que se desarrolla elimina a la bacteria de la mayoría de los órganos con excepción del riñón, donde queda acantonada y puede ser eliminada con la orina durante meses o años .

Los animales infectados contaminan el medio e infectan a los animales susceptibles. En el canino el comportamiento social de lamer los genitales de los congéneres, y olfatear los árboles aumenta el riesgo de contagio, penetrando por la mucosa oral y nasal .Estudios serológicos han demostrados que hay mayor cantidad de machos que hembras seropositivos.

En Argentina estudios seroepidemiológicos realizados en caninos de distintas localidades, dieron porcentajes de entre el 10 y 45 % de positividad, dependiendo de las zonas. Los aislamientos obtenidos fueron hasta el momento, *Leptospira interrogans* Canicola*, Leptospira interrogans* Icterohaemorrhagiae *y Leptospira interrogans* Pomona .

La leptospirosis en caninos es un problema de salud pública, dado el estrecho contacto que tienen las mascotas con el hombre.

Signos
Los signos clínicos pueden estar ausente o sucederse en forma rápida. Los más frecuentes son hipertemia, conjuntivas y mucosas hiperémicas, anorexia, vómitos, hemorragias, oliguria, anuria, lumbalgia, dolor renal a la palpación, debilidad, depresión, adinamia, mialgias, diarrea, ictericia, convulsiones, estomatitis, disnea, poliuria, hipotermia y muerte. Puede cursar con distintas presentaciones: subclínica, septicémico aguda, infección ambulatoria o crónica.

En caso de adultos, se pueden presentar casos severos o subclínicos. Los casos subclínicos suelen terminar con caninos urémicos y falla renal.

Recordemos que en los caninos la nefritis intersticial deja secuelas irreversibles.

Diagnóstico
El diagnóstico clínico se basa en la epidemiología, anamnesis y signos clínicos. La presentación es polimórfica lo que hace complejo el diagnóstico, por lo que los estudios de laboratorio son fundamentales para confirmar los casos sospechosos.
Diagnósticos: Aislamiento de una cepa de Leptospira interrogans de una muestra clínica;
Prueba MAT , primera determinación, título de corte, es 1/100
Inmunofluorescencia directa.
El aislamiento de leptospiras patógenas confirma el diagnóstico. Tambien puede realizarse la observación de orina del animal sospechoso, bajo microscopía de campo oscura.
Para el diagnóstico de laboratorio se debe intentar el aislamiento durante la primera semana de evolución de los síntomas, enviando sangre total heparinizada estéril. La muestra debe tomarse sin antibioticoterapia previa y extraída preferentemente durante el período febril (estado de leptospiremia) y debe acompañarse con una muestra de suero refrigerado, para tener un primer título serológico, primera determinación. Se debe enviar una segunda muestra de suero con un intervalo de 10 a 12 días y así comprobar si hay seroconversión.
La técnica de microaglutinación es la prueba serológica de referencia s y requiere el mantenimiento de cultivos vivos de los serovares necesarios como antígenos. En el caso del canino, se enfrenta a los serovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Castellonis, Pomona y Pyrogenes. Es necesario la toma de muestras pareadas para realizar un diagnóstico certero.
Con la técnica Molecular Multiple Variable Tandem Repeats, MLVA, se han detectado Canicola Hond Utrecht IV, Canicola Portlandvere, Icterohaemorrhagiae M20 e Icterohaemorrhagiae RGA:como los genotipos más importantes circulantes en Argentina, estudios basados en aislamientos a partir de orina.
Tratamiento
Los antibióticos tradicionales son la penicilina y la estreptomicina a dosis habituales. Tratamiento de sostén con solución de electrolitos por vía endovenosa y tratamiento sintomático.
La doxiciclina es una buena opción, utilizado también en el tratamiento de los humanos.
La infección del ser humano se produce por contacto de la piel o mucosas con medios húmedos contaminados con leptospiras.
Medidas de Control:

Evitar el contacto de la piel con aguas contaminadas; toda abrasión, sobre todo en miembros inferiores y manos, debe ser cubierta con apósito impermeable, y deben evitarse las salpicaduras, con barro o agua contaminada, en ojos y mucosas.
Desinfección de agua y suelo (Hipoclorito, lavandina).
Drenaje de agua
Animales silvestres, fuente de infección
Desmalezamiento, eliminación de basurales, escombros y todo lo que pueda servir de refugio y/o alimento para roedores
Animales domésticos en particular los perros, se debe evitar el contacto con la orina
Vacunación

HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA CLÍNICA EN LA APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA DE LEPTOSPIROSIS

Dra. Arauz María Sandra.[1]
1-Cátedra de Análisis Clínicos Veterinarios. Servicio Central de Laboratorio Hospital Escuela FCV-UNLP.
arauz@fcv.unlp.edu.ar

La hematología y la bioquímica clínica, tienen un papel destacado en el diagnóstico y control evolutivo de diversas enfermedades. La principal ventaja, radica en que se trata de una vía poco invasiva, de bajo costo y resultados en 24h o antes de acuerdo a la urgencia. Sin embargo para la realización de pruebas de laboratorio en medicina veterinaria la toma de muestra, conservación, almacenamiento y envío es fundamental, para evitar al máximo los errores pre-analíticos, ya que representan el 70% de los errores en los resultados obtenidos.
Un hemograma y la determinación de algunos metabolitos y enzimas correctamente realizados, permiten reconocer, localizar y finalmente instaurar el tratamiento adecuado en un gran número de entidades patológicas, además reduce las posibilidades de pasar por alto una enfermedad subclínica.
El diagnóstico de las enfermedades infecciosas en caninos basado solamente en la signología clínica es difícil, debido a las diversas formas de presentación de las mismas y en algunos casos, a la ausencia de signos clínicos patognomónicos. Es por ello que se combinan los datos obtenidos mediante la anamnesis, el examen físico, estudios hematológicos y bioquímica clínica para aproximar al diagnóstico presuntivo, el que luego se confirma mediante pruebas directas o indirectas consideradas como las técnicas *gold standard* para cada enfermedad. Además la realización de pruebas de laboratorio hematológicas y bioquímicas, contribuyen a una caracterización rápida del estado clínico del animal permitiendo elaborar un pronóstico más certero (4).
En el caso de leptospirosis, la importancia de evaluar los datos obtenidos mediante la anamnesis, signos clínicos y hallazgos de laboratorio radica en que los caninos como otras especies de animales de producción y silvestres además de padecer la enfermedad, pueden actuar como reservorios de determinadas cepas de *Leptospira* spp. Por lo tanto el hallazgo de animales positivos en muestras de orina mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, PCR) o el aislamiento por cultivo, o bien, la obtención de un alto título de anticuerpos en la prueba de aglutinación microscópica (MAT), sin antecedentes de exposición, signología clínica y alteraciones hematológicas y bioquímicas compatibles, podría representar a un animal portador. Además, una de las estrategias de control de la enfermedad, es la detección temprana en el hospedador reservorio como también el correcto diagnóstico e inicio del tratamiento en animales enfermos. En este aspecto, es donde adquiere importancia el desarrollo de una metodología diagnóstica que incluya la epidemiología, la clínica y los resultados de laboratorio para la detección de infecciones clínicas o subclínicas en animales de compañía. (1).

Leptospirosis en caninos: Cambios hematológicos y bioquímicos

La leptospirosis es una de las zoonosis bacterianas con importancia tanto en la Salud Pública como en la Salud Animal. En los caninos puede tomar un curso clínico o subclínico, a su vez, la enfermedad clínica puede presentarse en forma sobreaguda, aguda, subaguda o crónica y la gravedad clínica se ve influenciada por factores tales como, edad del paciente, estado inmunitario y virulencia del serovar infectante (2; 4; 5). El período de incubación hasta el desarrollo de los signos clínicos es de aproximadamente 7 días en estudios experimentales pero puede variar de acuerdo al estado inmunológico del animal y a la dosis infectante del microorganismo (9).
Las manifestaciones clínicas son variadas y ninguna es patognomónica. Entre las más frecuentes se encuentran: anorexia, letargia, vómitos, diarrea, pérdida de peso, hiperestesia muscular y deshidratación (3; 4; 5). Los caninos que presentan falla renal pueden manifestar, oliguria, anuria, poliuria o polidipsia de acuerdo al daño renal. Los animales que desarrollan una falla hepática muestran signos de ictericia, inapetencia, pérdida de peso, ascitis o encefalopatía hepática. La hematemesis, hematoquesia, hemoptisis, melena, epistaxis y hemorragias petequiales también pueden presentarse debido a la trombocitopenia y coagulación intravascular diseminada (2; 9).
Las anormalidades hematológicas más comunes encontradas en caninos con leptospirosis son leucocitosis neutrofílica con desvío a la izquierda y monocitosis, aunque durante la etapa de leptospiremia puede presentarse leucopenia. También se observa trombocitopenia leve a moderada como resultado del consumo aumentado, secuestro esplénico o destrucción inmunomediada de las plaquetas (2; 9). La anemia se ha observado en la mitad de los caninos con leptospirosis y puede ser leve a moderada debido a pérdidas por el tracto gastrointestinal, hemorragia pulmonar o por enfermedad inflamatoria (4; 5; 9).
En los caninos con falla renal las anormalidades bioquímicas más comunes son aumento de la urea y creatinina séricas. La disfunción hepática ocasiona aumento de la actividad sérica de las enzimas alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y fosfatasa alcalina así como hiperbilirrubinemia. Los caninos con alteraciones musculares pueden tener actividad creatin-fosfoquinasa aumentada. Por lo general, las alteraciones electrolíticas son paralelas al grado de disfunción renal y gastrointestinal. En la mayoría de los casos se pueden observar hiponatremia, hipocloremia, hipopotasemia e hiperfosfatemia, mientras que la hiperpotasemia se detecta en aquellos caninos con falla renal oligúrica o anúrica (9).
En un estudio que hemos llevado a cabo a partir de muestras de caninos sin signología clínica compatible de leptospirosis, provenientes de la zona de La Plata, analizamos 147 sueros, mediante la prueba de MAT utilizando como antígenos 9 cepas de *Leptospira* spp:*L. borgpetersenii* Tarassovi, *L. borgpetersenii* Castellonis, *L. interrogans* Canicola, *L. interrogans* Copenahgeni, *L. interrogans* Pomona, *L. interrogans* Pyrogenes, *L. interrogans* Hardjo, *L. interrogans* Wolffii y *L. kirschneri* Grippotyphosa. Se encontró una seroprevalencia de 26.53%. En los caninos seropositivos se observaron títulos de anticuerpos entre valores de 100 y 6400 siendo los serovares predominantes Canicola, Castellonis (Serogrupo Ballum) y Copenhageni (Serogrupo Icterohaemorrhagiae) (8). Los resultados de los valores hematológicos y bioquímicos de todos los pacientes sin signos clínicos que fueron seropositivos se mantuvieron dentro de los parámetros normales (6; 10). Esto indicaría que los animales no padecían la enfermedad, pues al evaluar todo en conjunto, la anamnesis, el examen físico, datos de laboratorio y los resultados serológicos, estos caninos habrían tomado contacto con la bacteria y eran portadores sanos.
En cambio en otro estudio que hemos realizado sobre 51 pacientes que asistieron al Hospital de la FCV-UNLP con sospecha clínica de leptospirosis, fueron confirmados mediante la prueba de MAT 7 y al realizarles además la técnica de la lipL32-qPCR

a partir de muestras de sangre y orina, el número de casos confirmados fue de 9. El resto de los 42 pacientes fueron considerados casos no confirmados. En la evaluación clínica, de los 9 animales considerados como casos confirmados, se observó un mayor porcentaje de signos clínicos como anorexia, decaimiento, vómitos, diarrea, polidipsia-poliuria, ictericia, hemorragias, conjuntivitis, congestión de vasos epiesclerales, necrosis lingual, dolor abdominal, dolor lumbar y mialgias que en el grupo de no confirmados. En los resultados de laboratorio el 55,6 % de los casos confirmados presentó leucocitosis y trombocitopenia no registrándose anemia en ninguno de estos pacientes. Mientras que en el 100 % se observó aumento de urea y creatinina. De acuerdo a los resultados de laboratorio obtenidos, la presencia de azotemia, con o sin leucocitosis en animales expuestos a factores de riesgo y signología compatible sugiere una fuerte sospecha de leptospirosis. Por lo cual, sería recomendable que ante esta posibilidad el veterinario actuante indique la realización de las pruebas confirmatorias de la enfermedad e inicie las medidas de prevención pertinentes para evitar el contagio a los humanos y a otros animales.

El diagnóstico definitivo de leptospirosis en animales no reactivos o con bajos títulos de anticuerpos con la prueba de MAT en una única muestra, no debería descartarse si los datos epidemiológicos, clínicos y alteraciones en los parámetros de laboratorio son compatibles. Además, para la confirmación rápida de los casos sospechosos sería conveniente incluir la remisión simultánea de muestras de sangre con EDTA y orina sin importar el tiempo de evolución de la enfermedad de cada paciente para la aplicación de la prueba de PCR (11).

Bibliografía

1- Fink JM, Moore GE, Landau R, Vemulapalli R. Evaluation of three 5' exonuclease-based real-time polymerase chain reaction assays for detection of pathogenic Leptospira species in canine urine. J Vet Diagn Invest. 2015;27(2):159-66

2-Fontaine GA. Canine Leptospirosis - Do we have a problem?. Vet. Microbiol. 2006; 117 19–24.

3-Goldstein, RE., Lin, RC., Langston, CE., Scrivani, PV., Erb, HN., Barr, SC. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. J Vet Intern Med. 2006; 20:489–494.

4-Gualtieri CAS, Carlín C; Peralta L; Peirone C; Gattarello V; Marc L, Molteni H, Arestegui MB, François S. Evaluación clínica, bioquímica y hematológica de caninos seropositivos a distintos serovares de Leptospira interrogans. InVet. 2012, 14(2): 131-139.

5-Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat / [edited by] Craig E. Greene. Fourth edition. 2012.

6-Kaneco J, Harvey W, Bruss, M. Clinical Biochimestry of Domestic Animals. California, USA. 5th Ed. Academic Press 1997, p. 895.

7-Knöpfler S, Mayer-Scholl A, Luge E, Klopfleisch R, Gruber AD, Nöckler K, Kohn B. Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. J Small Anim Pract. 2017;58(10):582-588.

8-Martin PL, Molina MC, Stanchi NO, Corrada Y, Cuelli A, Cobos M, Ozaeta MB, De Palma V, Arauz MS. Prevalencia de leptospirosis en caninos de La Plata. Argentina. 2014. Libro. Resumen. XX Reunión científico-Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico.

9-Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, Sykes J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. J Small Anim Pract. 2015;56(3):159-79.

10-Weiss DJ, Wardrop KJ. Schalm's Veterinary Hematology. 6th edition. 2010.

11- Martin PL. Tesis Doctoral: Diagnóstico de leptospirosis canina mediante una técnica de PCR en tiempo real. 2018.

BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A MICOTOXINAS

Sofía Noemí Chulze [1,2]

[1] Departamento de Microbiología e Inmunología ; Fac. de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto

[2] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Email: schulze@exa.unrc.edu.ar

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diferentes especies de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria* que se aíslan de granos y semillas de cereales, oleaginosas, frutas, y nueces. Aproximadamente el 95% de la contaminación con micotoxinas se produce a nivel pre-cosecha y a pesar de la utilización de medidas preventivas y del uso de buenas prácticas agrícolas, los estudios de incidencia de micotoxinas en alimentos para animales demuestran que los porcentajes de contaminación con micotoxinas son del orden del 81%. Una parte muy importante de una efectiva gestión del riesgo en micotoxinas es la determinación regular de la presencia de estas sustancias en las materias primas para la fabricación de raciones para animales. Los alimentos contaminados ingeridos por los animales de granja conducen a la exposición a las micotoxinas, con efectos perjudiciales para la salud. Los biomarcadores son una herramienta valiosa para medir exposición a nivel individual, evitando al mismo tiempo los problemas asociados con la contaminación heterogénea de los alimentos con micotoxinas. Los biomarcadores son beneficiosos cuando es necesario estudiar el desarrollo de la enfermedad y poder monitorear y controlar mejor las micotoxinas. Esto se debe a que su detección temprana puede proporcionar opciones de manejo para limitar las enfermedades y la acumulación de micotoxinas. Por más de tres décadas los científicos han estado trabajando en el desarrollo de biomarcadores para vincular los efectos sobre la salud y la exposición a la contaminación mediante la medición de un parámetro crucial en sangre u otras muestras fisiológicas. Los biomarcadores de exposición son específicos, pueden ser las propias micotoxinas o cualquiera de sus metabolitos y representan la dosis interna (micotoxinas absorbidas), mientras que los biomarcadores de efecto son generalmente inespecíficos y representan alteraciones estructurales o funcionales producidas en el cuerpo. Sin embargo, estas alteraciones pueden servir como biomarcadores de la exposición cuando ambos procesos están directamente relacionados. Por ejemplo: los esfingolípidos están directamente relacionados con la regulación de los procesos celulares, dada la alta similitud estructural entre la fumonisina y la esfinganina (Sa) o la esfingosina (So), la micotoxina inhibe la acetilación causando un aumento en la concentración de esfinganina libre y en menor grado de esfingosina libre, y una consiguiente disminución de esfingolípidos, lo que desencadena una serie de procesos que resultan en la enfermedad. Aunque los biomarcadores son herramientas valiosas en los estudios científicos, algunos investigadores consideran que se necesitan más conocimientos sobre los factores que influyen en la biodisponibilidad, la cinética y el perfil metabólico de las micotoxinas en los animales antes de que los biomarcadores puedan utilizarse en las granjas. Sin embargo pueden ser de mucha utilidad en la evaluación de la eficacia de agentes detoxificantes de micotoxinas que secuestran (binders) o alteran la estructura química (modificadores) de las micotoxinas en el tracto gastrointestinal de los animales, disminuyendo así la exposición de los animales a las micotoxinas. Tanto es así que la European Food Safety Authority (EFSA) ha establecido que la eficacia de estos compuestos debe evaluarse in vivo analizando la concentración de un biomarcador adecuado, es decir, el compuesto original y/o los metabolitos, en matrices biológicas. La plataforma de investigación de la asociación MYTOX 'MYCOTOXINS and TOXIGENIC MOLDS' en el International Symposium que se llevó a cabo en Bélgica en 2016 concluyó, entre otras cosas, que los desafíos para quienes trabajan en la investigación de las micotoxinas son enormes debido a la frecuencia, complejidad y variabilidad en la ocurrencia

y destaca que algunos de aspectos que contribuyen a dicha dificultad son: -La falta de biomarcadores adecuados para evaluar la exposición de seres humanos y animales; -La necesidad de niveles de guía de micotoxinas en los fluidos corporales de los animales; -Pruebas de eficacia y seguridad de desintoxicantes de micotoxinas y - Conocimiento de la toxicocinética en hombres y animales.

Bibliografía

Hopton, R. P., Oswald, I. P. Hardie L. J., Turner, P.C. Fisher J. (2012)Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Glucose Levels in Weanling Piglets Plasma as a Function of Deoxynivalenol Exposure. *International Scholarly Research Network ISRN Analytical Chemistry*. Volume 2012, Article ID 132543, 5 pages doi:10.5402/2012/132543.
Marinus F.W. Te Pas, Arend J.W. Hoekman and Mari A. Smits. (2011) Biomarkers as management tools for industries in the pork production chain. *Journal on Chain and Network Science* 11(2): 155-166.
Nagl. V., Woechtl , B., Schwartz-Zimmermann, H. E., Hennig-Pauka, I., Wulf-Dieter Moll, Gerhard Adamd, G., Berthiller, F. . (2014)Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in pigs. *Toxicology Letters* 229: 190–197.
Pinotti, L., Matteo Ottoboni, Carlotta Giromini, Vittorio Dell'Orto and Federica Cheli (2016) Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts Toxins, 8, 45; doi:10.3390/toxins8020045 www.mdpi.com/journal/toxins.
Songa, S., Njumbe Ediagea,E., Wub,A.; De Saeger, S. (2013) Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1292: 111– 120.
Xue, K. S., Wenjie Cai a, Lili Tang a, Jia-Sheng Wang (2016) Aflatoxin B1-lysine adduct in dried blood spot samples of animals and humans. *Food and Chemical Toxicology* 98: 210:219

RESISTENCIAS BACTERIANAS EN AISLAMIENTOS VETERINARIOS BOVINOS

Dr. Ramón Pedro Noseda [1]
1- Laboratorio Azul Diagnostico/rnoseda@laboratorioazul.com.ar

Se evaluaron in vitro las resistencias a 7 (siete) de los Antibióticos más frecuentemente utilizados por el Veterinario de campo sobre un total de 528 aislamientos bacterianos patógenos originarias de Síndromes Diagnósticos de el periodo 2012-2016, constituidas por cepas de: *Staphilococo aureus (71)- Actinomyces (Trueperella) pyogenes (66)- Bacillus anthracis (44)- Escherichia coli enteropatogena (131)-Salmonella (106)- Pasteurella multocida (78)- Pseudomona aeruginosa (32).*
Se utilizo el procedimiento de difusión de discos, una modificación de la técnica descrita por Kirb, Bauer, recomendada para los Laboratorios de diagnósticos clínicos, por su especificidad y reiteración de los resultados. Los criterios de interpretación de Sensibilidad – Resistencia fueron tomados de acuerdo al documento CLSI-M 100 (Clinical and Laboratory Standards Institute), aplicándose a cada uno de los antibióticos evaluados.
Se graficaron las Distribuciones Porcentuales de resistencia a 7 de los Antibióticos más frecuentemente: Penicilina- Ampicilina-Tetraciclina- Gentamicina- Florfenicol- Ciprofloxacina- Trimetroprima- Sulfametoxazol. Se compararon porcentualmente el conjunto de antibióticos que demostraron valores superiores al 25% de resistencia, cifra por encima de la cual no se recomienda la aplicación de un antimicrobiano en forma empírica.
Resultados: Penicilina: demuestra una resistencia porcentual del 57% sobre todas las cepas bacterianas aisladas, pero del 31% sobre las bacterias Gram positivas. La más resistente es la *Pseudomona aeruginosa* en un 100 % del total de cepas y el más sensible el Bacillus Anthracis con un 100% de sensibilidad. Ampicilina: demuestra una resistencia porcentual del 46% sobre el total cepas, siendo también la Pseudomona aeruginosa con un 97% la más resistente y el más sensible el Bacillus anthracis que no demostró resistencia. Tetraciclina: demuestra una resistencia porcentual del 40%, siendo también la Pseudomona Aeruginosa con un 90% la más resistente y los Bacillus anthracis los más sensibles con dicho antibióticos en un 100% de las cepas evaluadas. Gentamicina**:** demuestra una resistencia porcentual del 23 % sobre el total de cepas evaluadas, siendo la más resistentes Actinomyces Piogenes 57% y la más sensible Bacillus anthracis, con ninguna cepa resistente. Florfenicol: demuestra una resistencia porcentual del 21% sobre el total de cepas y la más sensible el Bacillus anthracis con ninguna resistente. Ciprofloxacina**:** demuestra una resistencia porcentual sobre el total de las cepas del 14%, siendo las cepas más resistentes los Staphylococcus aureus con un 40% y el más sensible el Bacillus anthracis con ninguna cepa resistente. Trimetroprima-Sulfametoxazol**:** posee una resistencia sobre el total de cepas del 50%, siendo las más resistentes el Bacillus anthracis un 100% junto a la Pseudomona Aeruginosa en igual porcentaje. **Observación desde las cepas bacterianas:** Mirando las cepas bacterianas y la aplicación de antibióticos para su uso podemos decir que los antibióticos que demostraron menor porcentual de resistencia por debajo del 25% resultaron: *Staphilococo aureus***:** Tetraciclina con 25% y Florfenicol con 15% son los menos resistentes sobre el total de los sietes antibiticos evaluados. *Actinomyces pyogenes:* demostró tener menor resistencia sobre 5 antibióticos: Penicilina 6%, Ampicilina 4%, Tetraciclinas 19%, Florfenicol 13% y Ciprofloxacina el 12%. *Bacillus anthracis:* fue sensibles a 6 de los 7 abióticos evaluados, siendo la Trimetroprima el único antibiótico con el 100% de resistencia. *Escherichia coli enteropatogena:* Tres antibióticos Gentamicina 7%, Florfenicol 14% y Ciprofloxacina 24% tuvieron valores inferiores al 25% de resistencia. *Salmonella:* ***Gentamicina*** 5%, Florfenicol 10% Ciprofloxacina 3% tuvieron valores de resistencia por debajo del 25%. *Pasteurella multocida:* Ampicilina 25%, Tetraciclina 21%, Florfenicol 3%, Ciprofloxacina 4% y Trimetroprima 24 %, tuvieron valores iguales o menores al 25 % de resistencia. *Pseudomona aeruginosa*: dos de los antibióticos evaluados, Gentamicina 20% y Ciprofloxacina 14% , estuvieron por debajo del 25% de resistencia. Los antibióticos que presentaron menor índice de resistencias en nuestra área sanitaria fueron el Florfenicol (21%) y la Gentamicina (23%). Mientras que los que mostraron mayor resistencia fueron la Trimetroprima (50%) y la Penicilina (57%), en tanto que la Tetraciclina demostró un 40% de resistencia pese al uso indiscriminado realizado con dicho antibiótico desde hace más de 40 años.
Para indicar un tratamiento racional es importante conocer los microorganismos que con más frecuencia producen las diversas enfermedades, en cada zona, así como también conocer los patrones de sensibilidad antimicrobiana y su evolución en el tiempo. No se puede resolver sólo desde la fiscalización y acciones regulatorias, siendo necesario generar conciencia en el ámbito Médico/ Veterinario y la comunidad en general.

ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS DE ANIMALES DE COMPAÑÍA: DETECCIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS

María Valeria Rumi[1]
[1]Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Microbiología. Chorroarín 280, Ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina.
mvrumi@fvet.uba.ar

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que actualmente, la resistencia a los antibióticos (RAM) constituye una de las mayores amenazas para la salud mundial, el desarrollo y la seguridad alimentaria. Día tras día están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia (R) que ponen en peligro la capacidad para el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes. Si bien la RAM es un fenómeno que aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas, el proceso se ve acelerado por el mal uso y el abuso de los antimicrobianos tanto en las personas como en los animales.

En veterinaria los antibióticos (AB) son usados con fines terapéuticos, profiláctico, metafiláctico y como promotores de crecimiento animal. Los dos primeros usos tienen el mismo fin que en medicina humana y se aplican para tratar y/o prevenir infecciones bacterianas. En animales de compañía se suelen utilizar sólo con fines terapéuticos. Se estima que en el mundo la mitad de los AB producidos se destina a uso veterinario, del cual el 80% va a producciones intensivas de bovinos, cerdos y aves, un 10% a mascotas y un 5% a piscicultura. Por otra parte, el 75 % de las enfermedades infecciosas provienen de los animales o sus productos. La utilización de antimicrobianos en animales es una práctica que contribuye a la eventual transmisión de organismos zoonóticos resistentes o diseminación de determinantes genéticos de R entre microorganismos. La exposición continua a los AB permite dicha selección en los microorganismos que han adquirido cambios en la información cromosómica a través de mutaciones, o han reclutado plásmidos, transposones o integrones mediante transferencia horizontal de genes.

La OMS, a principio del año 2017, publicó una lista de "patógenos prioritarios" resistentes a los AB, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. En la lista se pone de relieve especialmente la amenaza que suponen las bacterias gram negativas multiresistentes (MR), entre ellas, especies como *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Serratia* spp., y *Proteus* spp. que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales. Se considera MR a aislamientos bacterianos resistentes a 3 o más familias de AB. En nuestra experiencia el orden *Enterobacterales* son frecuentes agentes etiológicos aislados en muestras clínicas de caninos y felinos (32,38% de los aislamientos totales).

Hasta el momento, no existen datos nacionales sobre la cantidad de AB utilizados en los diferentes sistemas de producción animal ni los empleados sobre los animales de compañía. Los β-lactámicos son AB muy usados en veterinaria y su principal mecanismo de R es mediante la producción de enzimas β-lactamasas (plasmídicas o cromosómicas). Las β-lactamasas plasmídicas tienen mayor capacidad de diseminación en las diferentes especies (por su localización) y están muy extendidas entre las enterobacterias. Dentro de las β-lactamasas que hidrolizan las cefalosporinas de tercera generación (C3G) se encuentran las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), AmpC y carbapenemasas. Las BLEE pueden hidrolizar a todas las penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos pero no a cefoxitina ni carbapenemes; ellas son afectadas por los inhibidores clínicos de β-lactamasas como el ácido clavulánico y el sulbactam. Las enzimas tipo AmpC plasmídicas pueden hidrolizar a todas las penicilinas y cefalosporinas, incluyendo a cefoxitina; sin embargo no afectan carbapenemes ni son inhibidas por los inhibidores clínicos de β-lactamasas. Por su espectro de actividad, las carbapenemasas confieren R a casi la totalidad de los β-lactámicos. Estas β-lactamasas, que generalmente se hallan localizadas en plásmidos, pueden estar acompañadas de genes que codifican R para aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas y trimetoprima/sulfametoxazol, generando aislamientos MR difíciles de tratar.

En Argentina, se observó un incremento de aislamientos clínicos humanos R a C3G con β-lactamasas de codificación plasmídica principalmente debido a la participación de distintos grupos de enzimas BLEE tipo CTX-M y en menor medida AmpC. En aislamientos de *E. coli* recuperados de muestras clínicas (infecciones urinarias, otitis, lesiones dérmicas, etc) provenientes de caninos y felinos, hemos detectado cepas R a C3G, fenotípicamente caracterizadas como BLEE y AmpC. A su vez, observamos altos niveles de R a otros AB en quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina y levofloxacina), seguido por trimetoprima-sulfametoxazol, AB muy usado en cuadros urinarios, y en menor medida en aminoglucósidos como la gentamicina. No hemos detectado R para amikacina, ni para carbapenemes.

Por tal motivo, realizar un diagnóstico certero lo más rápido posible, contar con los datos de laboratorio, monitorear la evolución del cuadro clínico y hacer un uso responsable de los medicamentos ayudará por un lado, a combatir la resistencia bacteriana y, por el otro, a lograr nuestro objetivo principal: el éxito terapéutico del paciente. Para tal fin, es necesario realizar adecuadamente la determinación de la sensibilidad antimicrobiana, ya sea mediante ensayos cualitativos como el método de difusión con discos en placas de Mueller-Hinton agar, o mediante ensayos cuantitativos como la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por dilución en medio líquido. Los medios de cultivo, inóculo, parámetros de incubación y lectura se deben realizar según normas del *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2017) o según el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST- v.7.1).

Un punto a considerar en el laboratorio microbiológico, a la hora de realizar los estudios de sensibilidad antibiótica, es maximizar los datos que se pueden obtener mediante la caracterización fenotípica de los mecanismos de R. La ubicación estratégica de los discos de ceftazidima (CAZ), amoxicilina/clavulánico (AMC), cefotaxima (CTX), imipenem (IPM), meropenem (MEM) y ácido borónico permite evaluar la presencia de las distintas β-lactamasas. La distancia entre CTX, CAZ y AMC debe ser de 2,7 mm de centro a centro del disco. La presencia de "efecto huevo" o "corcho" entre estas C3G y AMC, es sospechoso de la producción de BLEE. Una diferencia en el diámetro del halo de inhibición CTX/CL y/o CAZ/CL ≥ 5mm comparado con el respectivo AB en ausencia de ácido clavulánico confirma la presencia de BLEE. La posible presencia de AmpC se evalúa colocando un disco que contiene ácido borónico 300 µg entre los discos de CAZ y CTX a 3 mm de distancia, centro a centro. Una deformación del halo de C3G o "efecto huevo" indica su sospecha. La búsqueda de carbapenemasa tipo KPC se realiza mediante la detección de sinergia (deformación del halo de inhibición) intercalando un disco de ácido borónico 300 µg entre discos de IMP y MEM ubicados a 2 cm. La confirmación y/o caracterización del tipo de β-lactamasas requiere el uso de métodos moleculares como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La correcta evaluación de las cepas resistentes a AB tanto en los hospedadores humanos, animales como en el medio ambiente ayudará a establecer estrategias profilácticas y terapéuticas frente a las patologías infecciosas prevalentes y emergentes circulantes en nuestra región.

Bibliografía

- Chioro, A.; Coll-Seck, A.M.; Høie, B.; Moeloek, N.; Motsoaledi; A.; Rajatanavin, R.; Touraine, M. (2015). Antimicrobial resistance: a priority for global health action. Boletín de la Organización Mundial de la Salud. Disponible en: http://www.who.int/bulletin/volumes/93/7/15-158998.pdf Consulta [08/08/18].

- Errecalde, J.O. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública. FAO-Producción y sanidad animal. - Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. 162:1-67. Disponible en: http://www.fao.org/3/a-y5468s.pdf Consulta [08/08/18].
- Ministerio de Salud y Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Resolución Conjunta 834/2015 y 391/2015. Boletín Oficial N° 33.160, 29 de Junio de 2015. Disponible en: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2016/01/RESOLUCION-BOLETIN-OFICIAL-29-6-15.pdf Consulta [08/08/18].
- FAO (2013). World Livestock 2013. Changing disease landscapes. Rome.
- Di Conza, J.A., Gutkind, G.O. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. Rev Argent Microbiol 42 (1): 63-78.
- Gutkind, G.O.; Di Conza, J.; Power, P.; Radice, M. (2013). β-lactamase mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. Curr Pharm Des 19 (2):164-208.
- Cejas, D.; Fernández Canigia, L.; Quinteros, M.; Giovanakis, M.; Vay, C.; Lascialandare, S.; Mutti, D.; Pagniez, G.; Almuzara, M.; Gutkind, G.; Radice, M. (2012). Plasmid-encoded AmpC (pAmpC) in *Enterobacteriaceae*: epidemiology of microorganisms and resistance markers. Rev Argent Microbiol 44: 182-186.
- Sennati, S.; Santella, G.; Di Conza, J., Pallecchi, L.; Pino, M.; Ghiglione, B.; Rossolini, G.M.; Radice, M.; Gutkind, G. (2012). Changing epidemiology of extended-spectrum β-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M15. J Antimicrob Chemother 56: 6003-05.
-Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI 2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seven Informational Supplement. CLSI M100-S27. United States. Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI 2013). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. Second Informational Supplement VET 01-S2. Wayne, PA.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters V. 8.1, valid from 2018-05-15. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf Consulta [08/08/18].

ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN LA UNIÓN EUROPEA Y PERSPECTIVAS PARA EL MEJORAMIENTO DE LOS PROGRAMAS DE CONTROL Y DE ERRADICACIÓN

María Laura Boschiroli
Laboratorio Nacional de Referencia Tuberculosis; Laboratorio de referencia Tuberculosis Bovina, OIE- Anses, Francia
Maria-laura.boschiroli@anses.fr

Desde la década de 1960, diferentes países de Europa han implementado campañas de control y de erradicación de la tuberculosis bovina. Estos planes han sido impulsados particularmente por la Unión Europea (UE) en el contexto de la Comunidad Económica Europea sobre la base legal de la Directiva EEC 432/64 de 1964, que regula los intercambios intra-comunitarios. Sin embargo, en los últimos 10 años, a pesar de que rige la obligación de aplicar estas reglas europeas homogéneas y comunes, la situación epidemiológica de los diferentes estados de la UE es muy contrastante. En efecto, varios estados miembros se sitúan de manera favorable por debajo de la tasa de prevalencia de 0.1% que permite que sean reconocidos como “libres de tuberculosis” (Francia, Alemania, Bélgica, Holanda, países escandinavos…) y los habilita a realizar intercambios comerciales sin restricciones. Otros estados, subvencionados por la UE en sus programas de control, han visto una mejoría con respecto a la tuberculosis (España, Portugal, Italia, República de Irlanda…); sin embargo, la situación en otros, como el Reino Unido, ha empeorado. Se analizarán los factores que llevan a estas diferencias de estatus epidemiológico en el seno de la UE. Asimismo se discutirán las nuevas disposiciones que la UE se prepara a incluir en la nueva Ley de Salud Animal en lo que se refiere a la detección y al diagnóstico de la tuberculosis bovina.

EXPERIENCIA EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS EN CAPRINOS Y OVINOS

Gabriel Magnano[1]
[1] Grupo de Sanidad en Rumiantes. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
gmagnano@ayv.unrc.edu.ar

¿Porque no podemos controlar y erradicar la tuberculosis en los rumiantes?
¿Son las técnicas diagnósticas con sus aciertos y errores?, ¿es la complejidad de la enfermedad?, ¿son las medidas sanitarias no aplicadas o aplicadas incorrectamente?... consideramos que cada uno de estos factores juega un papel importante y muchas veces decisivo para el saneamiento.
La producción ovina y especialmente la caprina, en la zona donde nuestra Universidad tiene influencia, y en otras partes del país, poseen características especiales, siendo la principal fuente de subsistencia de numerosos pequeños productores. Una de las dificultades que presentan estos sectores de escasos recursos económicos, es contratar técnicos que los asesoren y permitan llevar a cabo una correcta sanidad de sus majadas. Para casi la totalidad de los productores que a lo largo de los últimos años hemos realizado diagnóstico de enfermedades zoonóticas, entre ellas la tuberculosis, fue la primera vez que se aplicaban controles a sus animales. Enfrentarse a una enfermedad zoonótica, donde los principales expuestos son los mismos productores y su familia, y tener la necesidad de entregar respuestas concretas, genera un fuerte compromiso, responsabilidad y conocimiento de la temática.
Desde los primeros estudios sobre tuberculosis que hemos realizado en el grupo de Sanidad en Rumiantes, a fines de la década del 90, avanzamos enormemente en el conocimiento de las diferentes técnicas diagnósticas y su relación con la presencia de la enfermedad, ampliando también el conocimiento de su epidemiología. No obstante, profundizar en el conocimiento no significa directamente tener todas las respuestas que plantea esta patología.
Hoy, 20 años después, hemos observado en los caprinos dos situaciones epidemiológicas regionales claramente diferenciadas: por un lado zonas donde la prevalencia es elevada, (utilizando la prueba de Intradermorreacción -IDR- reconocida oficialmente por SENASA para el diagnóstico de tuberculosis animal en Argentina), con reacciones importantes en el lugar de inoculación de la tuberculina, majadas con antecedentes de síntomas clínicos e inclusive muerte de animales por tuberculosis, realizando necropsias y observando lesiones compatibles y aislamiento de micobacterias (en todos los casos

Mycobacterium bovis) y por otro lado regiones con prevalencias bajas, reacciones a la tuberculina más pequeñas, sin observar en estos animales positivos ni lesiones ni aislamiento de micobacterias.
En la siguiente tabla se detallan algunos de los resultados observados en caprinos IDR+, considerando animales infectados aquellos donde el cultivo de lesiones resultó positivo y/o las lesiones histopatológicas fueron compatibles con tuberculosis.

	Majadas estudiadas	Animales necropsiados	Animales Infectados	Animales No infectados
ZAP	9	54	47	7
ZBP	30	45	0	45

ZAP: zona de alta prevalencia ZBP: zona de baja prevalencia

Con respecto a los ovinos, es menor el número de establecimientos estudiados. En tres majadas, de diferentes propietarios, se realizaron tuberculizaciones, necropsias de animales IDR+ y diagnósticos complementarios. En una de ellas, donde las ovejas compartían el ambiente con bovinos infectados, se identificaron lesiones y se aisló *M. bovis*. En otra, con condiciones similares, no se identificaron lesiones ni aislamiento y en el tercer establecimiento, donde no había bovinos cohabitantes, los resultados de necropsia y cultivo fueron negativos.
Es necesario mencionar que en varios de los campos se realizaron conjuntamente muestreos de hisopados nasales y de ambiente (tierra, agua, comederos), identificándose diversas micobacterias atípicas.
En base a los resultados obtenidos podemos concluir que el comportamiento epidemiológico, patológico y los resultados de las pruebas diagnósticas no siguieron un patrón lineal.
Por lo tanto, consideramos necesario seguir investigando para mejorar las técnicas diagnósticas, pero fundamentalmente realizar estudios más profundos para conocer como se comporta la enfermedad tanto en el individuo como dentro de los establecimientos, especialmente en nuestras condiciones epidemiológicas; este último es el principal eje para lograr el control y la erradicación tan ansiada.
Finalmente consideramos, desde el grupo de Sanidad en Rumiantes, realizar un reconocimiento muy especial, a todos los productores, a los técnicos de instituciones estatales y privados, a los alumnos y a nuestra institución, con quienes trabajamos conjuntamente desde hace años investigando y generando conocimientos que aporten sobre esta temática.

APORTES DEL DIAGNÓSTICO POST MORTEM EN UN PLAN DE CONTROL Y ERRADICACIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA

Ana María Canal
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral-Esperanza.
acanal@fcv.unl.edu.ar

El plan nacional de control y erradicación de tuberculosis está basado en cuatro pilares fundamentales, el saneamiento y certificación de establecimientos, movimientos de bovinos, planes provinciales y vigilancia epidemiológica.
La vigilancia epidemiológica es un método de seguimiento y monitoreo, caracterizado por acciones prácticas, sencillas, accesibles técnicamente y con un bajo costo en su instrumentación; tiene como finalidad orientar acciones para controlar y erradicar la enfermedad. La misma puede realizarse a través de la inspección veterinaria obligatoria en frigoríficos que tiene como función primordial establecer una barrera de protección para el consumidor, preservando la calidad higiénico sanitaria del producto final y por otro lado, proveer información al programa de control y erradicación, identificando establecimientos, áreas y regiones con y sin tuberculosis. La vigilancia puede realizarse también en el propio establecimiento, a través de verificación de lesiones compatibles con tuberculosis en necropsias de bovinos que mueren por diferentes causas. En ambas ocasiones, la comprobación o no de lesiones, puede aportar datos importantes para evaluar el avance de un programa nacional y el proceso de saneamiento dentro del establecimiento.
La tuberculosis en los bovinos difiere notablemente en su presentación clínica y patológica. Se trata de una enfermedad que cumple su proceso evolutivo en distintos períodos caracterizados por sintomatología, lesiones y estados de hipersensibilidad propios de cada uno, donde la evolución de los mismos está condicionada a diversos factores ligados al huésped (estado inmunitario, edad, nutrición, genética, etc.), al bacilo (número, virulencia, vía de ingreso) y al medio ambiente. La prueba tuberculínica es el método oficial de diagnóstico para la identificación de bovinos infectados en los establecimientos.
Al inicio de un plan de saneamiento y cuando no se eliminan rápidamente los bovinos infectados, generalmente al realizar necropsia o a la inspección en faena, se van a observar en algunos bovinos, lesiones generalizadas, con granulomas en diversos órganos y formas perladas en las serosas de cavidades. Este tipo de presentación está indicando un cuadro de tuberculosis endémica, con infección crónica y transmisión activa entre los bovinos del establecimiento.
Cuando evaluamos otras categorías de bovinos, como por ejemplo terneros positivos a la intradermorreacción (IDR), y observamos lesiones generalmente miliares en pulmón, linfonodos bronquiales y mesentéricos; están indicando la persistencia de bovinos adultos infectados que eliminan micobacterias tanto por vía nasal como por leche, importante en la transmisión a los terneros. Considerando esto, y en base al patrón de lesiones presentes, podemos inferir la vía de ingreso de *M bovis* (digestiva, aerógena) y por ende tomar medidas de manejo (no dar leche cruda, pasteurizar o dar sustituto, etc.). La dosis infectiva, la viabilidad y virulencia del *M bovis* tiene vital importancia, así como la permanencia del ternero con la madre por más de 4 días (Garro y col., 2008).
Hemos observado en rodeos con alta prevalencia de infección en vacas (más de 25%), terneros de 3 y 4 meses con sintomatología nerviosa, presencia de lesiones multifocales y caseosas en tracto respiratorio, digestivo y meningitis granulomatosa.
La formación de granulomas en las infecciones por micobacterias está vinculada con una compleja activación del sistema inmune celular del animal, como resultado de una estimulación antigénica crónica y representa una respuesta del hospedador para localizar el proceso infeccioso.
Se han demostrado diversas vías por la cuales se produce la infección, siendo las más frecuentes la horizontal por inhalación o ingestión del agente, directamente de animales infectados o indirectamente a través de leche, pastos y agua contaminada. Por otra parte, la transmisión vertical es posible, pero actualmente rara de encontrar por la implementación de planes de control. Sin embargo, esta última debe ser considerada en establecimientos donde no se han eliminado los bovinos reaccionantes y éstos con el tiempo se han convertido en anérgicos, con lesiones diseminadas, incluso en útero y glándula mamaria. En caso de endometritis tuberculosa y preñez, puede haber transmisión congénita y el complejo primario suele ubicarse en hígado y linfonodos portales.

Por tal motivo, la búsqueda de lesiones debe estar dirigida principalmente a linfonodos retrofaríngeos, parotídeos, mediastínicos, bronquiales, hepáticos y mesentéricos, pulmón e hígado. De no encontrarse, la inspección debe realizarse en forma exhaustiva y minuciosa en un laboratorio a través de cortes seriados delgados a todos los linfonodos palpables y otros órganos en búsqueda de lesiones.

Cassidy y col. (1999) en un trabajo de infección experimental por contacto de bovino sano con bovino infectado, comprobaron que la enfermedad era menos severa que la producida usando instilación de *M. bovis* intranasal y que el patrón de lesiones en el primer caso eran pequeñas y limitadas al pulmón y linfonodos bronquiales y mediastínicos; mientras que las otras presentaban marcada mineralización temprana (35 días). Los autores pudieron recuperar por cultivo del tracto respiratorio superior y linfonodos retrofaríngeos al agente luego de 3 días y a los 7 días, de los linfonodos bronco-mediastínicos y mesentéricos. Entre 14 y 17 días, las lesiones macroscópicas y microscópicas fueron visibles. Las lesiones observadas en pulmón fueron similares, pero con variaciones en extensión y distribución. También Palmer y col. (2007) observaron lesiones microscópicas grado 1 (acúmulo irregular y no capsulado de células epitelioides, macrófagos, linfocitos, escaso número de neutrófilos y aisladas células gigantes de Langhans; no se observa necrosis caseosa) y obtuvieron aislamiento de la micobacteria a los 15 días tras inocular terneros, mientras que luego de los 28 días y hasta los 60 encontraron diferentes grados de lesiones en todos.

La asociación entre lesión inicial en la puerta de entrada y el linfonodo regional, constituye lo que se denomina “complejo primario”. A partir de allí, puede ocurrir una generalización con diseminación linfohematógena en animales con inmunosupresión, con presentaciones nodulares, perladas, miliares, o que permanezca como foco latente en bovinos con una mejor respuesta inmunológica. Estas dos formas, pueden en algún momento, evolucionar a una presentación secundaria o puede existir un nuevo ingreso de *M bovis* y realizar una reinfección. En todo proceso de saneamiento con la eliminación de reactores y manejo adecuado, no deberíamos encontrar tuberculosis secundarias y/o reinfecciones.

Las lesiones macroscópicas se caracterizan por ser granulomas con necrosis caseosa y calcificación, sin embargo, pueden diferir de acuerdo al tiempo de evolución y a la variabilidad de la respuesta inmune. Los granulomas al inicio de la infección pueden ser de 2 a 5 mm de diámetro, con necrosis caseosa, no enucleable, firme, con arenilla al corte y cápsula delgada. Pueden presentarse en diferentes órganos, van aumentando en número y se van uniendo formando granulomas de mayor tamaño, que modifican la forma del linfonodo o del órgano. Muchas veces observamos granulomas con bordes hiperémicos, indicando una reactivación secundaria con reblandecimiento del contenido caseoso y necrosis de la cápsula e invasión a tejidos vecinos. En los pulmones pueden formarse cavernas por la confluencia de nódulos a lo que se suma la fluidificación del material caseoso que se vuelca a los bronquios a través de úlceras, dichas lesiones son indicativos de un proceso secundario, crónico, que presupone la rotura del equilibrio huésped-*Mvcobacterium bovis,* constituido sobre una base inmunitaria en el período primario. En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, sobre 211 bovinos con tuberculosis, encontramos lesiones localizadas en linfonodos mediastínicos (n= 107), linfonodos retrofaríngeos (n= 68), pulmón (n= 59), linfonodos bronquiales (n= 29), hígado (n= 29), linfonodos mesentéricos (n= 25), pleura (n= 25), peritoneo (n= 9), linfonodos de la carcasa (n= 15) y gastrohepáticos (n= 4), bazo (n=2), y otras (n= 3).

Se debe tener en cuenta que no siempre es fácil determinar el sitio de infección primaria. El complejo primario puede pasar inadvertido a la inspección si ésta no se realiza de manera detallada y minuciosa, como mencioné anteriormente. Las lesiones pueden ser muy pequeñas o un complejo primario puede ser incompleto. Por tal motivo, un bovino IDR positivo podría no evidenciar lesiones durante la inspección en frigorífico o la necropsia. La sensibilidad del examen post mortem puede verse afectada por el método empleado y los sitios anatómicos examinados. El examen cuidadoso de tan solo 6 pares de linfonodos, los pulmones y los linfonodos mesentéricos puede dar como resultado que se detecten lesiones macroscópicas en el 95% de los bovinos (Corner,1994).

En establecimientos, a medida que avanza el programa de saneamiento y disminuyendo la tasa de bovinos infectados, se comienza a evidenciar lesiones no visibles (LNV) en animales PPD positivo enviados a faena, pudiéndose deber a infección reciente con lesiones de escasos milímetros, a un examen poco exhaustivo en el proceso de faena o a infección con otras micobacterias. En estos casos es importante una observación detallada de linfonodos y la toma de muestras (linfonodos) para estudios histopatológicos y microbiológicos. Esta información nos está indicando un buen trabajo de saneamiento, identificando tempranamente a bovinos infectados, evitando la permanencia y la disminución y/o ausencia de transmisión a otros, así como a especies silvestres, domésticas y a personas.

Podemos realizar un diagnóstico tentativo de tuberculosis bovina mediante la detección macroscópica de lesiones típicas en la necropsia y el examen histopatológico aumentaría la confianza del diagnóstico, permitiendo además poder realizar un diagnóstico diferencial con otras patologías. En un estudio, de 248 bovinos con lesiones compatibles, la confirmación de tuberculosis por cultivo fue de 84,3% y por anatomía patológica del 88,6%. A pesar que el aislamiento bacteriológico de *Mycobacterium bovis* de la lesión es la única forma de hacer un diagnóstico definitivo, sabemos que no es 100% sensible y depende de muchos factores (Garbaccio y col, 2016).

El estudio histopatológico de lesiones compatibles con tuberculosis es un método rápido, de alta confiabilidad por las características microscópicas y la observación de bacilos ácido alcohol resistentes. Las lesiones de tuberculosis representan el prototipo de inflamación crónica granulomatosa. La lesión inicial es microscópica *y* puede ser de tipo exudativa o productiva. La exudativa, donde predominan neutrófilos y linfocitos se observa en raras ocasiones de casos agudos con marcada proliferación bacteriana. La lesión productiva que comienza con proliferación de macrófagos, células epitelioides, linfocitos y células gigantes de Langhans, evoluciona con necrosis central de tipo caseosa que puede llegar a calcificarse. En la medida en que el organismo desarrolle resistencia, se forma en mayor o menor grado una cápsula de tejido fibroso alrededor del granuloma. La aparición de necrosis caseosa coincide con el desarrollo de hipersensibilidad retardada frente al agente, siendo un rasgo característico en la evolución de la tuberculosis. El número de bacilos ácidos alcohol resistente dentro de los granulomas generalmente aumenta con el grado de avance de la lesión. En los primeros estadios se encuentran dentro de macrófagos y células gigantes; en los estados avanzados en las zonas de necrosis. La tinción de Ziehl Neelsen modificada para cortes histológicos identifica bacilos acido alcohol resistente.

Bibliografía referente al tema:

Canal AM, Pezzone N, Cataldi A, Zumarraga M, Larzabal M, Garbaccio S, Fernandez A, Dominguez L, Aranaz A, Rodriguez-Bertos A. 2017.Immunohistochemical detection of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in granulomas in cattle with natural *Mycobacterium bovis* infection. Research in Veterinary Science 110.34–39.

Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F y Neill SD. 1999. Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated Calves. J Comp Path. 121: 321–337.

Cassidy JP. 2006. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. Vet Microbiol.112:151–161.

Corner LA, Melville L, McCubbim K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR y Rothel JS. 1990. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculosis lesions in cattle. Australian Vet J. 67: 389-392.

Garbaccio S, Barandiaran S, Fernandez A, Macias A, Magnano G, Martinez Vivot M, Peyrú M, Cataldi A. 2016. Ensayo interlaboratorio: aislamiento de *Mycobacterium bovis* a partir de lesiones granulomatosas en bovinos. Rev Argent Microbiol.48(2):161-165.

Garro C, Cobos Roldán M, Oriani S, Garbaccio S. 2011. Tuberculosis en terneros: resultados de un estudio prospectivo. REDVET. Volumen 12 Nº 12. http://www.veterinaria.org/revistas/redvet
Garro C, Morris W, Delgado F, Garbaccio S. 2011. Tuberculosis Bovina en Terneros. Vet. Arg. Vol. XXVIII - Nº 276.
Garro C, Paolicchi F, Späth EJA, Abdala A, Garbaccio S, Duffy S, León E. 2008. Asociación entre el manejo nutricional de terneras para reposición y la ocurrencia de tuberculosis bovina en rodeos lecheros. Revista Argentina de Producción Animal Vol 28 Supl.1.
Jorge C, Alito A, Bernardelli A, Canal AM, Cataldi A, Cicuta ME, Gentile F, Kistermann JC, Lopez B, Magnano G, Martínez Vivot M, Oriani DS, Paolicchi F, Perez A, Romano MI, Schneider M, Torres P y Zumárraga M. 2005. Manual de Diagnóstico de Micobacterias de importancia en Medicina Veterinaria.1 ed. AAVLD. ISBN:987-21667-1-4. Santa Fe. Arg.
Latini O, Canal AM, Ferrara ME, Sequeira MD, Sequeira G, Bagnaroli R y Torres P. 1997. Confiabilidad en la Determinación de Prevalencia de Infección por *Mycobacterium bovis* en Ganado bovino por Decomisos en Frigoríficos. Arch Med Vet. 29 (2):197-204.
Torres PM. 2011. Control de la tuberculosis bovina. Experiencia Argentina. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes y VII Congreso Argentino de Zoonosis. Buenos Aires. Junio 8-10. Pag.29.
Torres PM. Vigilancia Epidemiológica: Importancia de la detección en faena de la tuberculosis bovina . http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/
Wangoo A, Johnson L, Gough J, Ackbar R, Inglut S, Hicks D, Spencer Y, Hewinson G y Vordermeier M. 2005. Advanced Granulomatous Lesions in Mycobacterium bovis-infected Cattle are Associated with Increased Expression of Type I Procollagen, gd (WC1+) T Cells and CD 68+ Cells. J Comp Path. 133: 223–234.

EVALUACIÓN DE UN KIT DE GAMMA INTERFERÓN BOVINO PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA EN LA ARGENTINA

Paolicchi, Fernando A. [1]; Morsella, Claudia [1]; Mendez, Laura L. [1]; Zumarraga, Martin[2]; Eirin, Maria E. [3]; Frers, Enrique. [4]; DiSalvo, Vilma. [5];
1.Laboratorio de Bacteriología, EEA INTA Balcarce, Pcia. Buenos Aires, Argentina. 2.Instituto de Biotecnologia, INTA Castelar. 3.CONICET. 4.INTA R.G., Tierra del Fuego. 5.Laboratorio Regional Veterinario, R.G., Tierra del Fuego.
paolicchi.fernando@inta.gob.ar

Los programas de control de la tuberculosis bovina (TB) tienen como objetivo identificar a los infectados lo más temprano posible y minimizar el riesgo de transmisión de la enfermedad entre y dentro del rodeo, haciéndose necesario contar con pruebas sensibles y específicas. Los test utilizados para el diagnóstico de TB tienen implicancias sobre acciones regulatorias nacionales e internacionales, salud pública, restricción de movimientos, aislamiento de animales positivos y comercialización. En el diagnóstico ante mortem la clave es mejorar la precisión de las pruebas cutáneas primarias con el uso estratégico de pruebas complementarias *in vitro* permitiendo detectar tempranamente bovinos infectados con *M. bovis* y reducir el número de animales sacrificados como falsos positivos (De la Rua-Domenech et al., 2006). En Argentina se utiliza para el diagnóstico ante mortem de TB, la intradermo-tuberculinización de un derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPDb) para detectar una respuesta de hipersensibilidad retardada transcurridas 72 hs pos-inyección. La prueba de Interferón-Gamma (γ-INF) se realiza *in vitro* y el fundamento es determinar la respuesta inmune celular (CMI) del huésped contra la infección con *M. bovis* (Pollock et al., 2005). Esta se realiza en dos etapas, primero extracción de sangre heparinizada de los animales problema que se incuba preferentemente dentro de las 8-12 hs de la colección (Ryan et al., 2000 y Buddle et al., 2001) en presencia del antígeno PPDb y/o PPDaviar y con controles negativos y mitógeno. Después de 16-24 horas de incubación, los sobrenadantes de plasma se recogen y se mide la cantidad de IFN-γ producido por las células T mediante un ELISA, que se expresa en DO y se efectúa la interpretación (Madera y Rothel, 1994 y Madera y Jones, 2001). La infección con *M. bovis* se interpreta positiva cuando la producción de IFN-γ es mayor en la muestra estimulada con PPDb que con la obtenida en la muestra incubada con PPDa y/o con el control negativo de la prueba. Algunas ventajas de la prueba de γ-IFN: a) mejor sensibilidad (Se) respecto de la prueba intradérmica simple, así como de la prueba intradérmica doble comparativa, b) tiempo más corto para detectar respuesta al γ-IFN después de la infección (entre 1 y 5 semanas), c) repetición inmediata de la misma sin interferencia con el sistema inmune, d) no requiere segunda visita al establecimiento, e) interpretación objetiva y estandarizada en resultados de laboratorio, f) reduce problemas por malas instalaciones, equipamiento deficiente, error del operador, posibilidad de fraude, los que contribuirían a detectar menos animales infectados o reactores sospechosos, g) sensible a antígenos definidos permitiendo la diferenciación por la infección con otras micobacterias patógenas y por la exposición a micobacterias ambientales (Pollock y Andersen, 1997; Vordermeier et al., 1999; Pollock et al., 2000; Buddle et al., 2001; Waters et al., 2004; Jenkins et al, 2018). El trabajo aquí descripto consistió en estudiar el comportamiento del kit γ-IFN bovino (ID-Vet, France) a partir de normas internacionales (OIE) y requisitos nacionales (SENASA). El principal objetivo fue evaluar la performance del kit en poblaciones de bovinos en áreas de Argentina declaradas negativas y en áreas infectadas, calculando Se y especificidad (Es) respecto al aislamiento de *M. bovis*. Las muestras de áreas negativas fueron tomadas en la Pcia. de Tierra del Fuego, declarada libre de TB desde 2011, sobre un total de 153 bovinos, de diferentes edades (10 meses hasta 5 años), sexo y sistemas de producción (carne o leche) en establecimientos rurales (49%) y en animales enviados a faena sin lesiones compatibles (51%). Las muestras fueron tomadas al azar en diferentes días de la semana desde el lunes al jueves. Por otro lado, las muestras de sangre bovina de áreas infectadas correspondieron a 32 rodeos positivos a TB por intradermorreacción sumando un total de 1.896 muestras de la Pcia. de Buenos Aires. Desde estos rodeos positivos un total de 92 bovinos fueron enviados a faena y confirmadas lesiones compatibles en pulmón, hígado, parrilla costal, riñón, ganglio linfático retrofaríngeo, mediastinico e inguinal profundo, cultivados para aislamiento y caracterización por PCR IS*6110* de *M. bovis* y spoligotiping. La sangre heparinizada fue estimulada con los antígenos correspondientes, tanto provistos por el kit como los producidos en Argentina (PPDb y PPDa, comercial aprobadas por SENASA). El plasma obtenido fue procesado y se realizó la lectura de DO con lector de ELISA 450nm. Los resultados fueron expresados como S/P%, indicando el nivel de γ-IFN. De acuerdo a registros previos de la presencia o no de paratuberculosis, se utilizó un protocolo (1) para regiones con alta frecuencia de animales reaccionantes a PPDa, mientras que para regiones sin presencia de paratuberculosis se usó el protocolo 2. Para la interpretación se siguieron las indicaciones del fabricante dependiendo del uso de cada protocolo, 15% o 35%, respectivamente.

$$\text{S/P \%} = \frac{\text{DO muestra (PPD Bovis) - DO muestra (PPD Avium)}}{\text{DOCP - DOCN}} \times 100 =$$

En áreas libres los resultados arrojaron una Sp diagnóstica del kit ID Screen Rumiant γ-IFN ELISA muy buena, con un valor de 99,3% (Sp=VN/VN+FP=153/153+1=99,3%). Esta muestra positiva fue debido a un valor alto con el antígeno PPDa y este animal una vez faenado pudo confirmarse ser positivo al cultivo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* +IS*900* PCR. Los

resultados de la Se diagnóstica, sobre 92 muestras de sangre heparinizadas de bovinos PPDb positivos fue de 93,5% (Se=VP/VP+FN=72/72+5=93,5%). Para confirmar la infección tuberculosa los mismos fueron faenados en plantas frigoríficas y los tejidos evaluados por lesiones macroscópicas compatibles y cultivo de tejido para aislamiento y caracterización PCR-IS*6110* de *M. bovis.* Estos resultados indican una concordancia entre la técnica de γ-IFN y el cultivo+PCR del 85%. El kit demostró un funcionamiento adecuado según: a) resultados con lectura en la estimulación antigénica, con mitógeno y controles positivos/negativos muy clara y de fácil interpretación, lecturas de controles positivos y negativos muy homogéneas con un rango entre 0,84 y 1,40 de OD (promedio 1,15 OD) para los primeros, mientras que para valores de controles negativos el rango fue de 0,07 y 0,18 de OD (promedio 0,14 OD), b) funcionamiento sólido ya que las pruebas arrojaron resultados de alta repetibilidad con el uso de los diferentes componentes del kit (placas, buffers, soluciones de revelado y antígenos), sin errores en la traducción de resultados, c) plasticidad para uso de antígenos ya que el kit fue probado en paralelo con antígenos PPDb y PPDa provistos por el fabricante y con similares provistos por SENASA, arrojando datos altamente homogéneos y similares dando la posibilidad de uso de antígenos propios del país, d) ejecución sencilla, fácil manejo de los componentes y periodo de estabilidad de sus componentes una vez conservados a temperatura de 4ºC, e) altos valores de Se / Sp ya que son adecuados en relación al diagnóstico de la enfermedad en animales enfermos y con cultivo positivo de *M. bovis*, como así también en poblaciones negativas a tuberculina y sin lesiones en la faena de bovinos provenientes de regiones libres de TB. Para el uso adecuado de este kit, se debería contemplar el ajuste del punto de corte mediante el análisis de curvas ROC, para definir la necesidad de ajustar el mismo dentro de diferentes regiones del país, obteniendo un balance adecuado a cada situación o prevalencia de TB, además un previo entrenamiento para la correcta interpretación de resultados. Dados los resultados obtenidos en el presente estudio con una Se 93,5% y una Sp 99,3%, concluimos que el mismo resulta muy útil para ser utilizado como test complementario. Estos resultados indicarían que este kit resulta una herramienta diagnóstica importante para el control de TB en áreas con altas/medias prevalencias y los resultados podrían tener implicancias significativas en la interpretación de los test de diagnóstico de la TB actualmente usados en nuestro país y sobre todo en la decisión del destino a faena de animales positivos y sospechosos.

SERODIAGNÓSTICO: UNA POSIBLE HERRAMIENTA COMPLEMENTARIA

Sergio G. Garbaccio
Laboratorio de Micobacterias, Instituto de Patobiología, CICVyA-INTA
garbaccio.sergio@inta.gob.ar

La Tuberculosis Bovina (TBB) es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico, producida principalmente por *Mycobacterium bovis*. Este es un patógeno intracelular lo cual determina que la respuesta inmunológica predominante se efectúe mediante linfocitos T. Por tal motivo, el diagnóstico *ante mortem* se basa en pruebas que ponen en evidencia la respuesta inmune celular (RIC) por parte de los animales infectados. Es por ello que los dos ensayos más utilizados a nivel mundial son la intradermorreacción (IDR) o prueba de la tuberculina, y el ensayo de liberación del Interferón Gamma (γIFN); las cuales evalúan este tipo de respuesta inmune. El primero se basa en una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada a la inoculación intradérmica del derivado proteico purificado, mientras que el último detecta la liberación de γIFN por parte de linfocitos, tras estimular la sangre del bovino analizado. Por otro lado, trabajos realizados en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis*, indican que la respuesta inmune mediada por anticuerpos (RIA) es baja o ausente en la etapa inicial, incrementándose sustancialmente a medida que la enfermedad progresa [1-2]. En el mismo sentido, diversos autores sugirieron que dicha respuesta resulta evidente en estadios avanzados de la enfermedad, asociada a cuadros patológicos severos y a un incremento en la carga micobacteriana en el hospedador, pudiendo no responder a la IDR [3-4-5]. Estos bovinos han sido denominados “anérgicos” por carecer de una correcta RIC, aunque representan un gran riesgo para la población que integran, por tratarse de animales potencialmente bacilíferos. De esta manera, la permanencia de los mismos en los rodeos puede postergar los plazos de control y erradicación. Sin embargo, estos animales podrían ser detectados mediante un análisis serológico como por ejemplo el test de ELISA [6], complementando estratégicamente a la IDR y generando así un sinergismo diagnóstico. En la actualidad, la industria ha desarrollado *kits* comerciales basado en esta metodología (*M. bovis* Ab Test-IDEXX- EEUU y *BTB Ab ELISA-BioNote Inc.* República de Corea).

La sensibilidad y especificidad del ELISA ha demostrado resultados variables, siendo su sensibilidad una limitante para ser incorporada como única herramienta efectiva en el diagnóstico [3]. En este sentido, se presenta un amplio rango de sensibilidad, de acuerdo a los distintos trabajos realizados por diferentes autores, pudiendo oscilar entre 18% y 90% [7-8]. Dicha divergencia puede obedecer a múltiples factores tales como: I) los antígenos utilizados en cada ensayo, II) el contexto epidemiológico de la muestra de suero evaluada (sueros de bovinos IDR+, bacteriológicamente positivo, con presencia de lesiones compatibles con TBB o las distintas combinaciones de ellos), III) estadio de la enfermedad a detectar (infección reciente, etapa avanzada), IV) edad de los bovinos (terneros, bovinos adultos), V) momento de la recolección de la muestra, en relación con la aplicación de la IDR y su posible efecto *booster,* entre otros. Todas estas variables podrían explicar la disparidad en los resultados descriptos en los diferentes trabajos. Una clara muestra de ellos es el reporte realizado por Waters y col. [9], quienes describieron diversos valores de sensibilidad alcanzados, a través de un *kit* comercial de diagnóstico serológico (*IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME* EEUU); de acuerdo a las muestras pertenecientes a colecciones de sueros cedidas por distintos colaboradores del trabajo. De esta manera, obtuvieron un 74% de sensibilidad a partir de los sueros de Gran Bretaña (184 sueros analizados), 69% para sueros de Irlanda (n=130), 46% en el caso de Estados Unidos (n= 122) y 40% para Nueva Zelanda (n= 42). En este sentido, Trost y col. [10] hallaron diferencias en la sensibilidad del *kit* serológico arriba mencionado (ELISA-*IDEXX*), aplicado en Reino Unido, Estados Unidos y México siendo esta del 77% (n= 126), 45% (n= 146) y 9% (n= 128), respectivamente. Ellos concluyeron que las diferentes regiones geográficas no tendrían un rol influyente en estas variaciones. Siendo que el ensayo realizado fue el mismo para todos los casos, cabría pensar que los factores previamente mencionados podrían haber generado tales diferencias. Por otro lado, Harboe y col. [11] mencionan el efecto que ocasiona la aplicación de la IDR sobre la detección de anticuerpos, estimulando su producción en bovinos infectados. Estudios más recientes han demostrado que las respuestas de anticuerpos frente a *M. bovis,* se potencian mediante la aplicación de la prueba cutánea, generando una respuesta anamnésica o efecto *booster*. Este concepto fue profundizado más recientemente por Casal y col. [12], quienes demostraron el efector ocasionado por la aplicación de la IDR sobre los niveles de anticuerpos circulantes en bovinos con TBB; consiguiendo un aumento significativo en la sensibilidad del ELISA, pasando del 24% al 70%, cuando las muestras fueron colectadas 15 días post IDR. Asimismo, Waters y col. [13] mencionan el efecto *booster* como unos de los pilares de un eficaz diagnóstico serológico, junto con el progreso de la enfermedad en el individuo. En este trabajo, se describe un marcado aumento en la respuesta-*booster* en las semanas posteriores a la aplicación de la IDR permaneciendo dicho efecto por los próximos 2-3 meses. Si bien no se encuentra lo suficientemente estudiado, este fenómeno anamnésico estaría asociado a la acción de “linfocitos B memoria” generados originalmente durante la infección micobacteriana, pudiéndose luego reactivarse rápidamente a partir de una aplicación de la IDR [14].

En suma, los ensayos basados en la detección de anticuerpos para el diagnóstico de la TBB, se presentan con un gran potencial como complemento diagnóstico de la IDR. Su utilización estratégica (aplicación sobre bovinos IDR negativos pertenecientes a campos endémicos) fue sugerida recientemente por Waters y col. [15], quienes describen la posible identificación de bovinos infectados con *M. bovis* que evaden la respuesta a la IDR y pueden ser identificados a través de una plataforma serodiagnósitca. En el mismo sentido, nuestro equipo de trabajo se encuentra realizando un trabajo de investigación con el fin de concluir acerca del potencial uso del ELISA como complemento de la IDR. En un contexto sanitario como el de nuestro país, donde TBB es considerada una enfermedad endémica, el serodiagnóstico a través del ELISA podría complementar eficazmente a la IDR, en el intento de detectar el mayor espectro posible de respuesta inmune por parte del hospedador frente a *M. bovis*. La detección de la respuesta inmune humoral permitiría generar un sinergismo, junto a la IDR, en cuanto a la identificación de animales con TBB y avanzar de manera más eficaz en el control de la TBB.

Bibliografía:

1. Souza II, Melo ES, Ramos CA, Farias TA, Osório AL, Jorge KS, Vidal CE, Silva AS, Silva MR, Pellegrin AO, Araujo FR. 2012. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. Springerplus. 1(1): 77.
2. Amadori M, Lyashchenko KP, Gennaro ML, Pollock JM, Zerbini I. 2002. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 85 (4): 379-387.
3. Vordermeier M, Goodchild A, Clifton-Hadley R, de la Rua Domenech R. 2004. The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. Veterinary Record. 155, 37–38.
4. De la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res Vet Sci. Oct; 81(2):190-210.
5. Lepper AW, Pearson CW, Corner LA. 1977. Serological responses in experimental bovine tuberculosis. Australian Veterinary Journal. Vol. 53, (7), p. 301-305.
6. Plackett P, Ripper J, Corner LA, Small K, de Whitte K, Melville L, Hides S, Wood PR. 1989. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. Australian Veterinary Journal. 66: 15-19.
7. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, Francis B, Melville L, Small K, De Witte K, Tolson J, Ryan TJ, de Lisle GW, Cox JC, Jones SL. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. Veterinary Microbiology 31, 71–79.
8. Ritacco V, de Kantor IN, Barrera L, Nader A, Bernardelli A, Torrea G, Errico F, Fliess E. 1987. Assessment of the sensitivity and specificity of Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of Mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. Journal of Veterinary Medicine. 34, 119–125.
9. Waters WR, Buddle BM, Vordermeier HM, Gormley E, Palmer MV, Thacker TC, Bannantine JP, Stabel JR, Linscott R, Martel E, Milian F, Foshaug W, Lawrence JC. 2011. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. Clin. Vaccine Immunol. 18, 1882–1888.
10. Trost B, Stuber T, Surujballi O, Nelson J, Robbe-Austerman S, Smith NH, Desautels L, Tikoo SK, Griebel P. 2016. Investigation of the cause of geographic disparities in IDEXX ELISA sensitivity in serum samples from Mycobacterium bovisinfected cattle. Sci. Rep. Mar 7; 6:22763.
11. Harboe M, Wiker HG, Duncan JR, Garcia MM, Dukes TW, Brooks BW, Turcotte C, Nagai S. 1990. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis.J. Clin. Microbiol. May; 28(5):913-21.
12. Casal C, Díez-Guerrier A, Alvarez J, Rodriguez-Campos S, Mateos A, Linscott R, Martel E, Lawrence JC, Whelan C, Clarke J, O'Brien A, Domínguez L, Aranaz A. 2014. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. Veterinary Microbiology. 170: 342–351.
13. Waters WR, Thacker TC, Nelson JT, DiCarlo DM, Maggioli MF, Greenwald R, Esfandiari J, Lyashchenko KP, Palmer MV. 2014. Virulenceof two strains of Mycobacterium bovis in cattle following aerosolinfection. J. Comp. Pathol. 151:410–419.
14. Waters WR, Palmer MV, Stafne MR, Bass KE, Maggioli MF, Thacker TC, Linscott R, Lawrence JC, Nelson JT, Esfandiari J, Greenwald R, Lyashchenko KP. 2015. Effects of serial skin testing with Purified Protein Derivative on the level and quality of antibodies to complex and defined antigens in Mycobacterium bovisInfected Cattle. Clin. Vaccine Immunol. Jun; 22(6):641-9.
15- Waters WR, Vordermeier HM, Rhodes S, Khatri B, Palmer MV, Maggioli MF, Thacker TC, Nelson JT, Thomsen BV, Robbe-Austerman S, Bravo Garcia DM, Schoenbaum MA, Camacho MS, Ray JS, Esfandiari J, Lambotte P, Greenwald R, Grandison A, Sikar-Gang A, Lyashchenko KP. Potential for rapid antibody detection to identify tuberculous cattle with non-reactive tuberculin skin test results. BMC Vet Res. 2017 Jun 7;13(1):164.

CALIDAD DE AGUA PARA CONSUMO DE BOVINOS

Eduardo L., Fernández.
Grupo de Salud Animal. INTA EEA Balcarce.
fernandez.eduardo@inta.gob.ar

El agua químicamente pura es la combinación del hidrógeno con el oxígeno. En su estado natural, es clara, sin color, ni olor. Forma parte de la alimentación de los animales y después del oxígeno, es el componente más importante e indispensable para la vida sobre la tierra. Constituye el mayor peso de los animales y de los vegetales. Su falta puede producir la muerte más rápidamente que la de cualquier otro elemento. Los animales utilizan el agua para su nutrición y crecimiento, y la obtienen de tres fuentes: la contenida en el alimento (***agua ligada***), la que se produce durante el proceso de asimilación de los mismos (***agua metabólica***) y el agua de bebida (***agua libre***). Desde el punto de vista físico, el agua actúa en el animal como un amortiguador entre su propia temperatura y el ambiente. Desde el punto de vista nutricional, se comporta como un solvente universal. Favorece el ablandamiento y fermentación de los alimentos, permitiendo su asimilación y la excreción de orina y heces. El agua, si posee la salinidad adecuada, puede hacer una buena contribución al consumo de minerales por parte del animal, alcanzando valores en bovinos del orden del 20% para el calcio, 11% para el magnesio, 35% para el sodio y 28% para el azufre. Es el principal constituyente celular, formando parte de más de la mitad del peso del animal. Así, por ejemplo, un 55 % del peso corporal de una oveja es agua, y una vaca contiene un 60-70% de agua. Una forma interesante de visualizar este hecho es teniendo en cuenta que al comprar un kilo de carne, en realidad lo que se adquiere es aproximadamente 700 gramos de agua y apenas 300 gramos de materias sólidas. Las fuentes de agua para el ganado son los arroyos, lagos, ríos, charcos, lagunas, manantiales y/o pozos, siendo la de mayor importancia el agua subterránea. La calidad de las distintas fuentes está relacionada con la ubicación geográfica y depende mucho de la geología de la zona. El agua de represas artificiales varía significativamente en su composición química desde el llenado hasta su vaciado, aun cuando sea parcial. Esta variación está dada por la concentración y acumulación de desechos orgánicos producidos por los propios animales y de los arrastres en el proceso de llenado. El agua proveniente de corrientes superficiales es por lo general dulce, de baja concentración de sales totales, pero la misma puede variar de acuerdo a las regiones que atraviesa y al volumen de agua que acarrea en las

diferentes estaciones del año. En general, los requerimientos de agua por unidad de peso corporal disminuyen con la edad. Un bovino adulto consume entre un 8-10% de su peso en agua. Una vaca lechera puede consumir entre 38 y 110 litros de agua por día y un vacuno para carne de 26 a 66 litros. Las hembras preñadas consumen más agua que las vacías, y las lactantes más que las secas. Las vacas lecheras, son las que más agua consumen de todos los bovinos, en proporción a su tamaño corporal, debido a que tienen grandes requerimientos de agua para poder mantener su producción láctea, ya que entre el 85 y el 87% de la leche, es agua. El ganado lechero tiene una mayor demanda hídrica, la cual aumenta a medida que crece su nivel de producción.

Hay diversos factores que influyen sobre la cantidad de agua requerida por los animales, tales como: raza, edad, estado fisiológico, temperatura y humedad ambiente, velocidad del viento, contenido de proteínas e hidratos de carbono de la dieta, ingestión de sales, etc. Los factores que más modifican el consumo de agua son la temperatura ambiente y el tipo de alimento.

Al mismo tiempo, el tipo de animal (tamaño, raza, edad, sexo) hará que se modifiquen los requerimientos de agua por kilogramo de materia seca consumida. Por ejemplo, si un cebú adulto consume 2.5 litros, un vacuno británico necesitará 3.5 y un ternero hasta 7 litros por el mismo kilo de materia seca ingerida. El contenido de materia seca de los alimentos, que varía entre el 20 y el 80%, también actúa condicionando su ingestión de agua, siendo común la presencia de animales que no necesitan beber por estar pastoreando verdeos tiernos y aguachentos durante el transcurso del invierno. Alimentos como silajes, pasturas, tienen un alto porcentaje de humedad, mientras que los granos y los henos tienen un bajo porcentaje. Alimentos altamente energéticos, producen mucha agua metabólica, mientras que alimentos bajos en energía, producen poca. En general, todos los forrajes secos y concentrados, demandan un consumo de agua por parte del animal mayor, que los forrajes verdes. Un mismo animal puede consumir más o menos agua, según esté acostumbrado al tenor salino de la misma. Aun cuando en un principio la rechace, si el contenido de sales es tolerable, terminará por aceptarla (aunque disminuya su producción), luego de un período variable que dependerá del tipo de alimento que consume y del clima. Sin embargo, cuanto más **elevada sea la salinidad del agua,** mayor será la cantidad que requerirá para saciar su sed. La temperatura ambiente elevada, aumenta los requerimientos de agua en los animales. El aumento puede ser entre un 30 y un 60% en meses calurosos. Así, un animal para carne (450 Kg.), puede consumir 28, 41 o 66 litros de agua, según que la temperatura ambiente sea 4, 21 o 32º C, respectivamente. La ausencia de sombra, así como las temperaturas muy elevadas provocan un aumento del consumo, que puede reducirse facilitándoles refugio bajo los árboles y permitiendo que concurran a beber en las horas más frescas. También contribuyen a elevar la demanda, la baja humedad relativa ambiente o los vientos que aumentan la transpiración de los animales. En cualquier caso, el agua fresca cercana a los flotantes será la preferida, por lo que se recomienda proteger los bebederos con cubre flotantes reforzados, ya que son frecuentes las roturas de las boyas, cabezas de flotantes, etc., cuando los animales se agolpan a beber. Durante la privación de agua, hay pérdida de peso debida a la pérdida de agua desde los tejidos y desde el intestino, el cual actúa como reservorio que mantiene al organismo hidratado. Otro factor a tener en cuenta es la distancia a las aguadas. La frecuencia de consumo voluntario de agua para una vaca es de 3 a 4 veces por día. En las zonas áridas o semiáridas, generalmente de altura, los animales bajan a consumir agua cada 2, 3 o más días. En estos casos, el consumo puntual de agua es mucho más elevado que si se produce en 1 o 2 tomas diarias. El ganado prefiere beber agua varias veces al día. Si el consumo está limitado, el animal comienza a comer menos y más lentamente. La privación de agua generalmente resulta en pérdidas del peso corporal. Por otro lado, el exceso de agua sobre todo en terneros, causa diarrea. El mejor método es proporcionar diariamente agua fresca, limpia, a voluntad, cercana al lugar de pastoreo y de fácil acceso. La calidad del agua de bebida para los animales es tan importante como la cantidad. El agua que bebe el animal debe ser limpia, inodora, incolora e insípida. El pH debe ser neutro, o cercano a la neutralidad. La ingesta de agua de baja calidad determina pérdida de estado en los animales, falta de apetito, trastornos digestivos, reducción en la producción láctea, alteración en la reproducción y en los casos más extremos, la muerte. No obstante, en la práctica, es difícil determinar cuáles son las características que debe reunir el agua de bebida, ya que los animales suelen acostumbrarse con el paso del tiempo a determinada calidad de agua. El agua por sí misma no es tóxica. Los efectos tóxicos o nutricionales de la misma, son debidos al tipo de sales disueltas, a su concentración, forma iónica y comportamiento fisiológico. El agua, en estado líquido, toma la forma y la calidad del recipiente que la contiene; por lo tanto, la calidad del recipiente puede definir la calidad del agua. Los bebederos deben mantenerse perfectamente limpios, libres de materiales extraños, tales como restos de vegetales, animales, tierra, algas, etc. Dentro de los parámetros más importantes a determinar en el agua destinada a bovinos, encontramos: **Contenido de sales totales**: Se refiere a la suma de todos los compuestos solubles o disueltos en el agua. Se toma como valor límite superior 7000 mg/l para vacas de cría. En el caso de vacas de feed-lot o tambo, el valor límite se asume en 5000 mg/l. Por encima de esos valores la restricción de agua es seria y se hace desaconsejable su uso. Las sales más comunes que se encuentran en el agua son: cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos. El mayor problema que aparece como consecuencia de un elevado consumo de ST es la presencia de diarrea. Alto contenido de ST también deprimen la ingesta de alimentos y los animales presentan baja ganancia de peso. Los requerimientos de sales en invernada son mayores que en cría. Las razas lecheras son menos resistentes que las de carne. Si el animal se acostumbra a tomar agua dulce, no vuelve a tomar fácilmente agua de mayor salinidad. En general cuando se cambia de salinidad de agua, se debe tener cuidado si se pasa a un agua de mayor concentración salina. En general cuando se cambia de calidad de agua los animales tardan entre 15 a 20 días en acostumbrarse a la nueva agua. **Sulfatos:** Es la sal que posee el efecto más adverso sobre la salud debido a las combinaciones posibles: con el Mg para formar la sal de Epsom (sulfato de magnesio) y con el sodio, para formar la sal de Glauber (sulfato de sodio). Cuando estas sales se encuentran en exceso producen diarrea (principalmente la sal de Glauber) y le dan al agua sabor amargo (sobre todo la sal de Epson). El límite máximo de tolerancia para el ganado se considera de 1500 mg/l, valores de 1500 a 2500 mg/l produce diarrea temporaria y por encima de esos valores es posible que se produzca un rechazo natural del agua, y si el animal se ve obligado a consumirla probablemente presente pérdida del buen estado general, como consecuencia de una reducción en el consumo de alimentos y en la tasa de crecimiento. Pero además de estos problemas de salinidad los sulfatos reducen la disponibilidad de cobre por combinación con los sulfatos a nivel ruminal dando lugar a la formación de tiomolibdatos y sulfuros de cobre. Además, ***Goorenatne y col*** han relacionado altos niveles de sulfato en el agua y bajos niveles de cobre en la dieta con brotes de polioencefalomalacia como consecuencia de la destrucción de la tiamina a nivel ruminal. **pH:** El ph del agua de bebida puede variar entre 6-8.5. Se sabe que las ligeramente alcalinas, ph 7 - 7.5 son las mejores para el ganado. **Sodio:** Forma la sal más beneficiosa y común del agua, y a no ser que se encuentre en muy altas concentraciones no presenta efectos negativos sobre la salud animal. **Cloruros:** La forma más abundante es cloruro de sodio (NaCl), aunque también hay de calcio, magnesio y potasio. Es poco frecuente encontrar concentraciones por encima de 2000 o 3000 mg/l. El NaCl es una sal beneficiosa que le da al agua un sabor salado, lo que aumenta su palatabilidad. **Calcio:** El calcio le otorga a las aguas características de dureza. También es responsable de formación de cálculos en vejiga o riñón, así como irritación en vías urinarias. **Magnesio:** El magnesio también le otorga al agua características de dureza y el sabor amargo característico. Se consideran límites máximos para la vaca lechera 250 mg/l, para los terneros destetados 400 mg/l y para vacunos adultos 500 mg/l. Altas concentraciones de magnesio provocan diarrea (generalmente por sulfato de magnesio) y además el agua resulta poco palatable. **Flúor:** El fluoruro está normalmente presente en las aguas naturales subterráneas y generalmente las concentraciones más altas se asocian a las aguas de estas fuentes. Las intoxicaciones crónicas provocadas por la absorción repetida de pequeñas dosis de derivados fluorados se conocen con el nombre de fluorosis y se refieren en general al consumo de aguas relativamente ricas en flúor con concentraciones superiores a 2 ppm. La mayoría de las aguas

contienen 1 ppm, con concentraciones mayores a 1,5 ppm se han observado manchas en los dientes, con niveles entre 3,0 a 6,0 ppm puede producirse fluorosis ósea.

MARCADORES BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS EN EL DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE TRASTORNOS METABÓLICOS EN VACAS LECHERAS

Fernando Wittwer[1]
[1]Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
fwittwer@uach.cl

Los procedimientos de diagnóstico de rebaño constituyen una herramienta útil para monitorear, diagnosticar y controlar las enfermedades que los afectan. En dicho contexto los marcadores bioquímicos corresponden a analitos que pueden ser cuantificados en muestras de sangre o fluidos corporales como leche u orina y que definen el grado de equilibrio metabólico logrado mediante la homeorresis. Basado en este concepto desde los años setenta se han utilizado los "perfiles metabólicos" (PM), técnica que a lo largo de los años se ha ido adaptado a diferentes sistemas y especies productivas e incorporando nuevos marcadores o formas de aproximación, acorde con las realidades locales y los avances científicos y tecnológicos.
Un **PM** es una técnica de evaluación y diagnóstico de las *"enfermedades de la producción",* realizado con el propósito de monitorear la salud metabólica del rebaño y contribuir a establecer las alteraciones y enfermedades que afectan la producción. Para su ejecución se determinan indicadores del balance metabólico nutricional y del estrés metabólico en grupos de animales representativos del rebaño. Los resultados obtenidos se comparan con intervalos de referencia poblacionales (IR) o umbrales críticos (cut-off), indicando así el grado de adecuación de las principales vías metabólicas relacionadas con la energía, proteína y minerales, así como la funcionalidad de órganos vitales para la producción como el hígado y la salud o bienestar de los animales. Su mayor utilidad se ha centrado en el estudio de los desbalances metabólicos nutricionales que se presentan durante el período de transición e inicio de la lactancia. Su empleo se ha promovido bajo dos sistemas, a) *"evaluación del riesgo*" de presentación de trastornos metabólicos e inflamatorios en las vacas en transición y b) "*prospección de desbalances metabólicos"* en lotes de vacas agrupadas acorde a su condición fisiológica, productiva o sanitaria.

Evaluación de Riesgo

Determina biomarcadores o metabolitos definidos durante el período de transición con el propósito de establecer el riesgo que individuos de un rebaño cursen posteriormente con enfermedades específicas. Bajo este enfoque, se determina en algunos animales la concentración sanguínea de un analito en un período definido y sus resultados se comparan con un umbral crítico. Las vacas con resultados fuera de dicho umbral definen el mayor riesgo de cursar posteriormente con una patología definida. Considerando que la mayor presentación de trastornos metabólicos e inflamatorios es al final del período de transición e inicio de la lactancia, la estrategia de muestreo se ubica en el preparto o inmediatamente después del parto.
Esta técnica se ha empleado mayormente para definir las vacas que cursan con BEN e hipocalcemia. Con dicho propósito se determinan las concentraciones séricas de NEFA y ßHB, colesterol o Ca, las que se asocian con incremento en las presentaciones de enfermedades del posparto (cetosis subclínica y clínica, desvío de abomaso, retención de placenta y metritis) (Cuadro 1). Se ha señalado que vacas con concentraciones de NEFA preparto de >0,3 y posparto >0,7 mmol/L o de ßHB posparto >1,0 mmol/L tienen una menor probabilidad de preñez y su producción de leche se verá disminuida.
Definir el porcentaje de vacas con valores alterados de un analito en el período de transición, permite proyectar resultados individuales a la performance del rebaño en aspectos de salud, producción o fertilidad en la lactancia posterior, constituyendo una alarma de futuras pérdidas esperables de mantenerse dicha condición (Cuadro 2).
El número de animales a muestrear en un momento varía acorde a variables estadísticas (error aceptado, prevalencia esperada, número de animales en riesgo) y analíticas (precisión y exactitud de la técnica). Así para NEFA y BHB en un rebaño de 1000 vacas con 3 a 4 partos diarios, que tendría ±35 vacas en riesgo, se deberían muestrear 14 vacas (con IC de 75% y error de ±10). Actualmente aconsejan usar esta técnica determinando ßHB cada 2 semanas en 20 vacas de 3 a 14 días posparto (ejemplo de rebaño de 1000 vacas) y en caso de haber 15% a 40 % de positivas (ßHB ≥1,2 mmol/L), controlar todas las vacas en riesgo dos veces a la semana y tratar las positivas con propilen glicol, si la prevalencia es >40% se deben tratar todas las vacas en riesgo desde el día 3 de lactancia por 5 días y continuar el monitoreo bisemanal.

Cuadro 1. Concentraciones séricas de ácidos grasos libres, (NEFA); ß-hidroxibutirato (ßHB) y calcio (Ca), de vacas en transición y riesgo de presentación de enfermedades al posparto.

Bio marcador	Punto de corte	Días del parto	Enfermedad	Riesgo	Referencia
NEFA	0,5 mmol/L	3 a 21	Todas	4,2	Van Saun 2006
"	0,3 "	-14 a -3	K+DA+RP+M	1,6	Ospina et al. 2013
"	0,6 "	3 a 14	"	1,9	"
ßHB	1,0 "	3 a 14	"	3,1	"
"	1,2 "	1 a 21	K	3,1	Sepúlveda y Wittwer 2017
"	1,2 "	1 a 7	M	3,3	Duffield et al 2009
Ca	2,0 "	21 a 21	Todas	4,0	Van Saun 2006
Mg	0,7 "	-21 a 21	HipoCa	1,9	Sepúlveda y Wittwer 2017
"	0,7 "	-21 a 21	M	1,6	"

**K= cetosis; DA= desvío de abomaso; RP= retención de placenta; M= metritis*

Cuadro 2 Asociación entre el porcentaje de vacas lecheras en transición con concentraciones séricas aumentadas de NEFA o BHB con alteraciones productivas y de fertilidad posterior.

% vacas sobre punto corte	Biomarcador (mmol/L)	Día muestreo#	Alteración	Magnitud
≥ 15*	NEFA ≥0,3	-3 a -14	Prod leche 305 ds	-282 kg/vaca/rebaño
≥ 15*	NEFA ≥ 0,6	+3 a +14	Prod leche 305 ds	-288 kg/vaca/rebaño
≥15*	ßHB ≥ 1,2	+3 a +14	Prod leche 305 ds	-534 kg/vaca/rebaño
≥15*	NEFA ≥0,3	-3 a -14	% preñez 70 ds	-1,2 veces
≥30**	NEFA ≥ 0,5	-1 a -7	Leche 1ºcontrol	-3 kg/d/vaca
≥15**	ßHB ≥0,8	-1 a -7	Leche 1º control	-4,4 kg/d/vaca
≥30**	NEFA ≥ 1,0	+1 a +7	Preñez 1º servicio	0,6 Odds Ratio

*# referido al día de parto. Datos de: *Ospina et al 2013; **Chapinal et al. 2012.*

Una variación dentro de este esquema de PM en bovinos lecheros ha sido propuesta por investigadores italianos, la cual promueve evaluar los procesos inflamatorios en el peri-parto mediante el "Índice de funcionalidad hepática (LFI)", índice que se obtiene de establecer los cambios en las concentraciones séricas de albumina, colesterol y bilirrubina entre los días 3 a 28 posparto, definiendo cuantitativamente la magnitud de la inflamación en el período de transición posparto y su efecto en la producción, fertilidad y salud posterior de la vaca.

B. Prospección Diagnóstica.

Constituye el enfoque tradicional de los PM siendo a la fecha la forma más utilizada en la evaluación de la condición metabólica de los rebaños lecheros en Chile. Se determinan varios biomarcadores en muestras de sangre obtenidas de uno o más grupos de vacas seleccionadas del rebaño y cuyos resultados se comparan con intervalos de referencia poblacionales (IR). Se emplea para evaluar el balance metabólico-nutricional e identificar los potenciales factores responsables por la presentación de enfermedades.

El PM evalúa el balance o equilibrio metabólico, así como los cambios que se producen durante el período de transición en la vaca, o de otros períodos críticos en grupos de animales. La realización de un PM en un rebaño involucra cinco aspectos: a) objetivo que motiva realizar el examen; b) los grupos y vacas a ser muestreadas; c) los análisis requeridos; d) sus resultados y e) su interpretación.

El propósito general del PM es "obtener lo antes posible la opinión de un grupo de animales sobre su condición metabólica nutricional y sanitaria". Basado en este concepto un PM está indicado cuando se pretende: evaluar y controlar el balance metabólico de un grupo de animales acorde a sus ingresos (nutrición), circulación (capacidad de movilización y regulación interna) y egresos (producción); diagnosticar la presencia de trastornos metabólicos en un rebaño; establecer la presencia o ausencia de un factor asociado a la presentación de enfermedades, problemas de fertilidad o baja productividad en el rebaño; servir de instrumento de evaluación metabólica como ser la evaluación de respuesta a intervenciones nutricionales en grupos de animales. Bajo estas condiciones es factible evaluar el estado nutricional del rebaño, detectar en forma temprana alteraciones en su salud, identificar riesgos potenciales para la presentación de enfermedades y analizar sus posibles causasorientando al médico veterinario en sus decisiones.

La muestra debe ser obtenida de individuos y grupos *"representativos"* de la población de animales. La muestra puede corresponder a 1 o más grupos, donde cada grupo está conformado por 6 a 14, comúnmente 8 animales, en similar condición genética, fisiológica, de manejo y alimentación. El momento más apropiado para obtener las muestras es en el PT, cuando los mecanismos homeostáticos se encuentran desafiados e inefectivos y con mayor incidencia de enfermedades de la producción. Considerando los aspectos indicados, el grupo habitualmente muestreado en un rebaño lechero corresponde a las siguientes categorías: a) vacas en transición pre-parto: 3 a 21 días preparto, idealmente 3 a 14 días; b) vacas en transición pos-parto: 3 a 21 días en lactancia, idealmente 7 a 21 días; c) vacas en inicio de lactancia: 45 a 80 días de lactancia, idealmente 50 a 70 días. En lecherías de gran tamaño se recomienda sub dividir los grupos o bien obtener un número mayor de muestras por grupo. Por ejemplo, con un lote de 200 vacas en lactancia se puede dividir en dos sub grupos por producción o edad. De cada animal seleccionado se obtiene la o las muestras requeridas acorde con los exámenes a solicitar. Habitualmente corresponden a muestras de sangre (± 5 mL con heparina y 5 mL sin aditivo para obtener suero), las que deben ser obtenidas idealmente posterior al ordeño de la mañana.

La prueba tiene un enfoque amplio que incluye analitos que reflejan el balance de energía (NEFA y ßHB, colesterol), proteínas (urea y albúmina) y macro y micro minerales (Ca, P, Mg, Na, Cu, Zn, Se). El panel de análisis es flexible pudiendo reducirse o ampliarse según las circunstancias. Habitualmente se incluyen marcadores para evaluar la condición de salud hepática (AST, GMD, GGT) y actualmente se está avanzando en la incluir marcadores asociados a inflamación y bienestar animal (hemoglobina, haptoglobina, globulinas). La selección de los marcadores bioquímicos dependerá del requerimiento diagnóstico, posibilidades analíticas, muestras obtenidas y los costos involucrados.

El resultado de cada grupo de animales se presenta en un cuadro que incluye para cada animal los resultados obtenidos en cada uno de los analitos evaluados con su media (X), mediana, desviación estándar (DE), y porcentajes de animales sobre y bajo los límites de referencia. Además, para cada analito se incluye los valores de referencia (X y DE) utilizados para comparaciones. Se determina el valor "H" que representa la diferencia entre el valor promedio del grupo con el promedio de referencia, expresados en una misma escala de medida (DE). Vale decir, indica la diferencia entre la media del grupo en estudio con respecto a la media de referencia expresado en desvíos estándar. También para cada analito se presenta el coeficiente de dispersión "CD" que corresponde a comparar la magnitud de la dispersión de los valores del grupo con relación a la dispersión que presenta la población de referencia. El otro resultado que se entrega del grupo de animales de la muestra son los porcentajes de animales cuyos valores para cada analito están bajo y sobre los límites del IR.

La interpretación del PM permite lograr una conclusión referente a la condición metabólica - nutricional y de salud de un grupo de animales (rebaño, piara, cardumen) de un sistema de producción animal. Para dicho propósito se requiere considerar el objetivo por el cual fue solicitado y las causas de variación de un analito: a) fisiológicas (preñez, lactancia, ambiente); b) analíticas (errores de muestra y metrológicos) y patológicas (desbalances metabólicos nutricionales y sanitarios). Si el PM considera más de un grupo se deben analizar los resultados de cada grupo ordenados acorde con su estado productivo, transición preparto – transición posparto - inicio de lactancia, y luego relacionarlos entre ellos. Se considera que el grupo es diferente a la población de referencia, por ende, presenta una alteración cuando: el valor de "H" es mayor a 2 (positivo o negativo), indica que la media del analito difiere en más de ±2 DE a la media poblacional, siendo positivo cuando está aumentado o negativo cuando está disminuido y/o el valor de "CD" es mayor a 1, indica que la varianza del grupo es mayor que la de la población de referencia, indicando una gran diferencia entre los individuos del grupo, situación que se asocia errores de manejo.

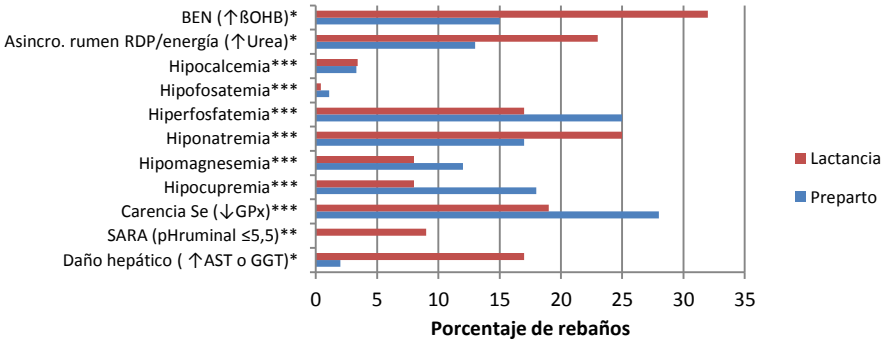
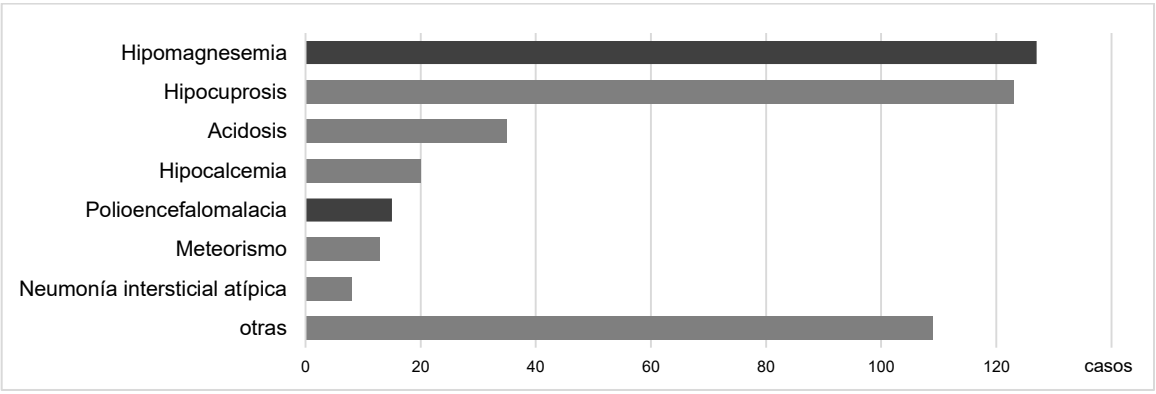


Figura 3. Porcentaje de rebaños con alteraciones metabólicas diagnosticadas mediante perfiles metabólicos en 3216 grupos de vacas preparto e inicio de lactancia del sur de Chile. *(Datos de: Weschenfelder et al. 2010*; Noro et al. 2011**; Wagemann et al. 2014**).*

CASUÍSTICA DE ENFERMEDADES METABÓLICAS DE BOVINOS DIAGNOSTICADAS POR EL INTA BALCARCE. HIPOMAGNESEMIA Y POLIOENCEFALOMALACIA

Germán José Canton[1]
[1] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), EEA Balcarce.
canton.german@inta.gob.ar

Teniendo en cuenta el aumento estimado de la demanda de alimentos de calidad por parte de una población humana creciente, nuestros sistemas ganaderos de producción de carne y leche deberían ser capaces de tratar de cubrir esa demanda. En ese contexto futuro, en las próximas décadas, deberemos mejorar la eficiencia de la producción ganadera, sin aumentar la superficie utilizada para tal fin. En ese sentido, la eficiencia de nuestros rodeos bovinos debe ser mejorada. Es necesario mejorar los parámetros reproductivos: lograr que las vacas se preñen en el menor tiempo posible y que paran normalmente un ternero saludable. Además, estos terneros debe sobrevivir su crianza al pie de la madre y llegar a un peso de destete apropiado. Posteriormente, la ganancia de peso de estos terneros durante su invernada o engorde a corral debe ser acorde, sin tener implicancias productivas negativas, ya sea desde bajas performances, o en el peor de los casos, mortandades.
El Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) del INTA EEA Balcarce, funciona desde el año 1969 y en ese transcurso de tiempo ha atendido más de 40.000 consultas por problemas sanitario/productivos en sistemas de producción pecuaria de la región. Más del 90% de la casuística, corresponde a problemas sanitarios en rumiantes, principalmente bovinos, en sistemas de cría (principal sistema del que se reciben consultas), así como de tambo, engorde pastoril o a corral.
Las enfermedades metabólicas representan un gran porcentaje de esta casuística, siendo mucho más frecuentes en sistemas de engorde a corral (24,3% del total de las consultas) en comparación con bovinos menores de 1 año de edad en sistemas pastoriles (17,3%), de entre 1 y 2 años (15,0%) o adultos (11,9%). Sin embargo, este resultado no necesariamente demuestre la relativa importancia de las enfermedades metabólicas de acuerdo a la edad de los animales, sino las dificultades que su identificación pueda tener en el diagnóstico, teniendo que recurrir al laboratorio para poder identificar la etiología.
La mayoría de las enfermedades metabólicas de los rumiantes son adquiridas y asociadas a prácticas tendientes a mejorar o aumentar la producción, porque las reservas minerales o de energía (entre otras) no cubran las demandas metabólicas de un animal productivo. En ese sentido, las enfermedades de la producción más frecuentemente diagnosticadas por el SDVE en bovinos se muestran en el gráfico 1.
Gráfico 1. Principales enfermedades metabólicas diagnosticadas en bovinos por el SDVE del INTA Balcarce entre 1997 y 2004 (adaptado de Späth y Becker 2012).



Teniendo en cuenta esta información, esta charla estará focalizada en la experiencia del SDVE en el historial de casos de Hipomagnesemia, enfermedad “tradicional” de nuestra región, y en el de Polioencefalomalacia, enfermedad “emergente” en diferentes sistemas productivos.

Hipomagnesemia

La hipomagnesemia es un desorden metabólico de los rumiantes provocado por un aporte insuficiente de Mg al organismo (deficiencia primaria), por una incorrecta digestibilidad o por factores metabólicos que impiden su normal utilización (deficiencia secundaria). Esta enfermedad de la producción es la principal causa de muerte de vacas en rodeos de producción de carne en

la provincia de Buenos aires. Se la considera multifactorial ya que intervienen diferentes aspectos (animal, clima, suelo y planta) en su presentación. En el historial del SDVE se registran en promedio 10 episodios de mortandad por año, aunque algunos años, la media es ampliamente sobrepasada. La mayor presentación se durante el periodo junio-octubre, coincidiendo con factores ambientales, forrajeros y de manejo de los bovinos que predisponen a su presentación. En el análisis histórico de la enfermedad, la mortalidad promedio es del 3,0% (rango 0,0-28,3%). El 86,7% de los episodios ocurrieron en vacas de diferentes razas. Estos animales tenían una condición corporal muy buena a buena en el o regular en el 94,8% de los episodios. En el 72,6% de los brotes, los animales habían parido antes de presentarse el episodio. Se describieron signos clínicos concordantes en un 78,9% de los episodios, mientras que en el resto solo aparecieron vacas muertas sin poder apreciar signos previos. En estos episodios, los animales consumían pasturas implantadas (46,9%), campo natural (26,9%), verdeos (9,2%), entre otros. Estas pasturas estaban compuestas por diferentes especies, muchas veces consociadas. La magnesemia promedio de animales del rodeo afectado, era de 1,37±0,42mg% (media±desvío estándar) (valores de referencia: 1,8-3,2mg%). En las muestras de humor vítreo de animales muertos que fueron analizadas, se encontraron concentraciones de 1,60±0,51mg% de Mg (valor de referencia: 2,2mg%). El análisis de potencial tetanizante de muestras de alimento permitió corroborar que en el 67,8% de los casos se trató de una deficiencia primaria, mientras que en el 8,5% se trató de deficiencia secundaria, y en el restante 23,7% se registraron simultáneamente deficiencias primaria y secundaria. Durante los meses en los cuales se registraron más episodios y en los años con mayor registro (2001, 2010 y 2012), las precipitaciones fueron 28,1% más altas que el resto de los años, la radiancia media fue 5,3% más baja y la temperatura media fue 1,9% más alta. Estos resultados confirman los factores previamente citados asociados a la presentación de hipomagnesemia clínica: categoría animal, condición corporal, estado fisiológico, signos clínicos previos, alimentos consumidos, valores de magnesemia y Mg en HV y condiciones climáticas durante la época de mayor presentación. Sin embargo los factores: origen de los animales y las especies que componían las pasturas quizás hayan estado confundidas por la proximidad del origen de las muestras al SDVE, especies forrajeras más frecuentes. Esta información podría llegar a colaborar en la toma de decisiones para prevenir la presentación de ésta enfermedad con el objetivo de reducir las severas pérdidas económicas que genera en nuestros sistemas ganaderos.

Polioencefalomalacia de origen nutricional

La Polioencefalomalacia (PEM) es una enfermedad neurológica que afecta principalmente a rumiantes y ha sido asociada a una deficiencia de tiamina o excesos dietarios de S, entre otras etiologías, sin embargo su patogénesis no ha sido totalmente dilucidada. Se analizaron retrospectivamente los episodios de PEM registrados en bovinos de la provincia de Buenos Aires en el SDVE entre 2001 y 2014, que fueron confirmados por diagnóstico histopatológico de sistema nervioso central (SNC). Se contabilizaron 49 episodios, 4±2,2 episodios por año, observándose una clara estacionalidad, con el 55% de los reportes entre septiembre y noviembre. La morbilidad promedio fue de 4,5% y una mortalidad promedio de 2,5%. La mayoría de los episodios se registraron en novillos (73,5%) y vaquillonas (16,3%). En todos los episodios se describió signología nerviosa, siendo los signos más frecuentes: ataxia, ceguera, depresión y opistótonos. No se observaron diferencias en la alimentación que los animales consumían: engorde a corral (39,5%), en pastoreo (30,2% y en pastoreo con suplementación (30,3%). En los sistemas de engorde a corral, los episodios se registraron con mayor frecuencia entre julio y septiembre, mientras que en los pastoriles o pastoriles con suplementación, la mayoría ocurrieron entre septiembre y noviembre. La respuesta al tratamiento con tiamina inyectable en el 80% de los casos fue satisfactoria. En más del 50% de los episodios, se analizaron muestras de SNC donde no se identificó Herpesvirus bovino, diagnóstico diferencial de la PEM. Los hallazgos clínico-patológicos en todos los episodios analizaron fueron compatibles con PEM. Se pudieron detectar diferencias interanuales marcadas, sin embargo no se pudieron determinar características meteorológicas que expliquen estas variaciones. Se evidenciaron diferenciales estacionales, que podrían ser explicados por diferencias en la nutrición que reciben los animales de terminación. Es llamativo la ausencia de asociación entre la dieta suministrada, ya que según la bibliografía internacional las dietas de engorde a corral suelen ser predisponentes para los cuadros de PEM. La respuesta favorable al tratamiento, signología clínica manifestada por los animales y la presencia de lesiones compatibles permitieron confirmar el cuadro patológico. Sin embargo, aún no ha podido ser determinada la etiología, ya que hasta la fecha, en la región, no se ha podido corroborarse un exceso de S en las dietas de estos animales, situación diferente a las de otras regiones del país. Es imprescindible tratar de identificar el factor dietario que participa en la patogénesis de la PEM en nuestra región, para poder establecer herramientas de manejo para prevenir la enfermedad.

Bibliografía

Cantón G, Odriozola E, Cseh S. Análisis de casos de hipomagnesemia en bovinos de producción de carne diagnosticados en INTA EEA Balcarce (1998-2013). XX Reunión Científico Técnica de la AAVLD. Tucumán, Argentina. 2014.

Cantón G, García J, García J, Moreno F, Morrell E, Odriozola E. Análisis retrospectivo de episodios de Polioencefalomalacia en bovinos diagnosticados en INTA EEA Balcarce (2001-2014). XLIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. 2015.

Späth E, Becker B. Análisis epidemiológico de 8 años de diagnósticos de enfermedades de los bovinos. Grupo de Sanidad Animal, INTA Balcarce, 1997 al 2004. Boletín Técnico Nº 160. ISSN 0522-0548. 2012.

CONSECUENCIAS PRODUCTIVAS DE LA CARENCIA DE COBRE EN BOVINOS

Guillermo Alberto Mattioli [1].
[1] Facultad de Cs. Veterinarias, Univ. Nac. de La Plata. mattioli@fcv.unlp.edu.ar

La carencia de cobre (Cu) o hipocuprosis es la segunda carencia mineral en bovinos sobre sistemas extensivos, y una de las más graves en Argentina. En nuestro país se presenta de manera compleja, con concentraciones subnormales en los forrajes, pero a su vez con factores de interferencia como molibdeno (Mo), azufre (S) o hierro (Fe) que complican su disponibilidad. Estos factores adquieren poseen mayor importancia en condiciones de excesos hídricos, los cuales aumentan la absorción de Mo y de Fe en el forraje, pero además aumentan la producción de forraje fresco, generalmente abundante en aminoácidos azufrados que se suman al aporte de S por el agua de bebida. El aumento en el aporte de alimento es siempre un factor predisponente de las carencias minerales, ya que cubren requerimientos energético-proteicos y llevan a los animales a expresar su potencial productivo, aumentando los requerimientos minerales.

La carencia de Cu en bovinos posee una expresión clínica característica, generando alteraciones del color del manto (acromotriquia) y anteojeras, que avanzan con diarreas, deformaciones osteoarticulares, fracturas espontáneas, caquexia y muerte. Sin embargo, desde el punto de vista productivo son más graves las consecuencias inaparentes y persistentes, que se sostienen ante la falta de diagnóstico y prevención. Estas pérdidas subclínicas incluyen la menor ganancia de peso, la menor resistencia a infecciones y la menor eficiencia reproductiva. El riesgo potencial de estas fallas se diagnostica en base a los niveles plasmáticos de Cu. Para ello resulta útil subdividir los valores de cupremia en tres rangos: por encima de 60 µg/dL (normocupremia), entre 60 y 30 µg/dL (hipocupremia leve) y aquellos menores de 30 µg/dL (hipocupremia severa). La normocupremia sugiere que los animales no se hallan expuestos al desbalance. La hipocupremia leve, en cambio, es indicativa de que la reserva hepática de Cu ya no es capaz de mantener el nivel plasmático normal, pero posiblemente no se vean afectadas las enzimas Cu dependientes a nivel tisular, debido a que los animales no suelen mostrar signos clínicos importantes de la enfermedad ni responden a la suplementación con Cu en los ensayos dosis-respuesta. La hipocupremia severa es indicativa de un desbalance de Cu más importante, con la posibilidad de que si se mantiene lo suficiente exista ahora un compromiso enzimático, debido a que con valores inferiores a 30 µg/dL se presentan las principales consecuencias de la enfermedad, primero subclínicas y luego clínicas.

En un intento por cuantificar las pérdidas productivas de la carencia de Cu se han realizado ensayos de suplementación en poblaciones expuestas. Estos ensayos dosis-respuesta consisten en la comparación de un grupo suplementado y un control negativo que mantuviera valores de carencia.

Las evaluaciones de la hipocuprosis sobre las ganancias de peso se han realizado mediante pesajes periódicos, empleando animales de tres meses de edad y hasta el momento del destete. El empleo de animales menores de tres meses puede ser innecesario ya que hasta ese momento el ternero conserva un depósito de Cu hepático generado al final de la gestación. Los citados ensayos han demostrado que una carencia severa, diagnosticada por niveles de Cu plasmáticos menores a 30 µg/dL dejan de ganar entre 10 y 30 kg de peso al final del ensayo. La diferencia entre niveles de pérdidas son generados por el aporte de alimento, en años con buen aporte los animales llegan a mayores pesos al destete, pero la diferencia de peso entre suplementados y no suplementados también es mucho mayor. Por esta razón la suplementación con Cu se considera esencial durante este período. Por otro lado, y considerando la importancia de generar una reserva hepática durante la vida fetal, resulta interesante la suplementación de la madre gestante. Trabajos realizados en este sentido demuestran que los animales nacen con mayor reserva hepática de la madre, pero además, si esas madres se encontraban en carencia, la suplementación mejora el desarrollo fetal y condiciona desde su vida uterina el peso al destete. Cuando los períodos de crecimiento corresponden a recrías o a engordes las consideraciones son similares, aunque la existencia de suplementaciones orales, especialmente en engordes, reducen los riesgos.

Las consecuencias reproductivas también se evaluaron en ensayo dosis–respuesta. Estos trabajos no permitieron establecer el origen de dichas alteraciones, vale decir si sin propias de la deficiencia de Cu o dependían de un exceso de Mo en la dieta. La presencia de Mo, más que el bajo nivel de Cu sería el responsable de la menor fertilidad, causando demoras en la aparición de la pubertad, menores tasas de concepción y alteraciones del ciclo estral, con compromiso de la síntesis y liberación de gonadotrofinas. En un ensayo con cultivos in vitro de células tecales, la adición de tiomolibdatos al medio inhibió la diferenciación celular mediada por LH, disminuyendo su producción de androstenediona, situación que se revirtió suplementando el medio de cultivo con Cu. Estos estudios confirman la base de la asociación original entre la hipocuprosis y las fallas reproductivas. Rodeos lecheros de Inglaterra exhiben una subfertilidad generalizada, con disminución o ausencia de celos, y que revierte con la suplementación de Cu. Estos autores sugieren que estos cuadros son debidos a fallas en el desarrollo de las células de la granulosa estimuladas por FSH y disminución en los niveles de estrógeno. Actualmente existen nuevas evidencias que relacionan a un inadecuado aporte de Cu con numerosas alteraciones de la reproducción, siendo un factor común en estos casos la existencia de estrés oxidativo, alteraciones estructurales y fallas energéticas. En animales con carencia severa se han observado aumentos de la fertilidad hasta en 10 puntos porcentuales por la suplementación con Cu.

Las consecuencias inmunológicas de la carencia de Cu poseen muchas más evidencias in vitro que certezas sobre rodeos en sistemas productivos. De cualquier modo se ha asociado la hipocuprosis con una menor respuesta inmune innata, menor producción de citocinas y fallas en la respuesta adaptativa humoral y celular. Ensayos donde se asociaron parámetros inmunológicos y ganancias de peso se observó una fuerte asociación entre ambos, sugiriendo que los menores índices de crecimiento podrían deberse a demoras en la resolución de fallas inmunes a nivel subclínico, ya que este hallazgo precedió a un aumento en la incidencia de enfermedades.

Se concluye que la carencia de Cu sería responsables cuadros clínicos característicos, pero que estos no representan el costo productivo de la enfermedad, sino que los mismos se deben a fallas en el crecimiento, en la respuesta inmune y en fallas reproductivas que al presentarse de manera subclínica pueden pasar desapercibidas, especialmente al asociarse a períodos de buen aporte de forraje.

LIBERACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE SELENIO DESDE ALFALFA

Lic. Emilio César Brambilla[1]
[1]Laboratorio de bioquímica clínica veterinaria, Producción Animal, EEA INTA Balcarce.

Introducción

El selenio (Se) es un oligoelemento esencial dado que forma parte de diversas Se-proteínas. Actualmente se conocen más de 30 Se-proteínas que tienen al Se como cofactor para su actividad biológica. Entre estas se encuentran 6 glutatión peroxidasas, vinculadas al metabolismo antioxidante; 3 deiodinasas-iodotironina, vinculadas a la funcionalidad de la hormona tiroidea y 3 tioredoxin-reductasa, vinculadas a la regulación rédox de las células (Pappas et al., 2008).

El alimento es la principal fuente del mineral para los animales. En mamíferos el Se es absorbido principalmente en el duodeno. En rumiantes, existe poca evidencia de absorción en rumen, abomaso, yeyuno e íleon (Surai 2006).

Al considerar la biodisponibilidad del elemento es necesario analizar su eficiencia de absorción, que es el cociente entre el Se que ingresa y el que se absorbe. Dicha eficiencia depende, entre otras cosas, de la especie animal. Los no rumiantes y pre-rumiantes lo absorben con una eficiencia del orden del 77 al 85 % del Se ingerido. En cambio, los rumiantes tienen una menor y más variable eficiencia de absorción, del orden del 29 al 59 %. Esta disminución está dada por el accionar de los microorganismos ruminales, ya que pueden absorber el Se y hacerlo parte constitutiva de sus proteínas, lo que lo vuelve insoluble e indisponible para el animal. De esta manera, se considera que los rumiantes son más vulnerables a trastornos originados por deficiencia del elemento (Suttle, 2010).

La bibliografía consultada reporta que al aumentar el tiempo de permanencia del alimento en el rumen (menor calidad) mejora la utilización y absorción del mineral. En contraparte, al mejorar la calidad de la ración consumida por los rumiantes, aumentan los requerimientos del mineral (Underwood, Suttle, 2003; Dijkstra et al., 2005; Noguera, Ochoa, 2007; Suttle, 2010).

Dado que la liberación ruminal del Se contenido en el alimento afecta su disponibilidad, es relevante caracterizar este proceso, del que hay escasa información en la bibliografía. Es así que en este trabajo se planteó el objetivo de caracterizar la liberación *in vitro* del Se desde alfalfa (Medicago sativa L.) hacia el fluido ruminal (FR), ya que es la principal especie forrajera utilizada en el país, y la base de la producción de carne y de leche en la región pampeana (Pagliaricci et al., 2002).

Materiales y métodos

Recolección de alfalfa:

La alfalfa utilizada fue obtenida en la EEA INTA Balcarce, ubicada en ruta 226 km 72,5 km (37º47'40,1'' S; 58º17'54,9'' O) en el inicio del verano de 2015. El muestreo se basó en transectas con inicio aleatorio hasta colectar aproximadamente 5 kg de material fresco. El material se secó en estufa a 60ºC hasta peso constante y luego se molió a 1 mm. Esta se encontraba en un estadio que Ponce (2011) define como vegetativo tardío, con algunas ramificaciones auxiliares pero sin presencia de botones florales.

Obtención del fluido ruminal y estudio de la liberación ruminal *in vitro* de Se:

El FR se obtuvo el día del ensayo colectando contenido ruminal desde un animal fistulado donante. El material ruminal extraído se estrujó a través de un paño de quesería y el líquido obtenido fue transportado al laboratorio en un termo, conservando así la temperatura del mismo. En el laboratorio se volvió a pasar por el paño para separar el material particulado restante y obtener así el FR para el ensayo.

El análisis de la cinética de liberación y solubilización ruminal de Se se llevó a cabo mediante un estudio in vitro, en un incubador Daisy. Este aloja cuatro jarras de digestión con una tapa que permite la salida del gas generado. En el equipo, las jarras rotan suave y constantemente a una temperatura de 39,5 °C simulando las condiciones del rumen. En éstas se colocaron 2200 ml de volumen total entre FR, saliva artificial y 25 bolsitas filtrantes Ankom con 500 mg de alfalfa seca y molida (según correspondía). Las bolsitas Ankom fueron pre-tratadas con acetona, secadas al aire y, luego de colocarles la alfalfa, selladas térmicamente.

Las 4 jarras de un equipo se distribuyeron de la siguiente manera:

Tratamiento 1: (T1) 3 jarras con 440 ml de FR + 1760 ml de saliva artificial + 25 bolsitas con 500 mg de alfalfa, que permitieron cuantificar el Se aportado por el FR per se más el liberado desde la alfalfa por el accionar microbiano sobre el forraje, sumado a la solubilidad propia del mineral en medio acuoso.

Jarra testigo: 1 jarra con 440 ml de FR + 1760 ml saliva artificial, la que permitió caracterizar descriptivamente la posible variación de Se en el tiempo en ausencia de la alfalfa.

De cada jarra se realizaron 10 extracciones de 20 ml en los siguientes horarios: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 12 y 24 h, considerándose como momento cero aquel en que se agregaron las bolsitas con alfalfa para su digestión. Los horarios fueron escogidos luego de realizar 2 pruebas exploratorias de liberación ruminal in vitro de 48 h, en las que se observó mayor variabilidad en el contenido de Se al inicio, por lo que se buscó aumentar los puntos de muestreo en los primeros horarios y no considerar más allá de las 24 h.

Análisis de Se en FR:

El análisis del contenido de Se en FR y soluciones se realizó mediante una digestión ácida y posterior cuantificación por plataforma de hidruros acoplado a un espectrofotómetro de absorción atómica.

Análisis estadístico:

Para contrastar T1 y JT solo a nivel descriptivo y asumiendo que los valores obtenidos para JT pudieran considerarse como valores poblacionales, se utilizó un modelo de medidas repetidas para caracterizar la diferencia en la concentración de Se entre T1 y JT a través del tiempo. Si la diferencia en la concentración de Se entre T1 y JT cambiaba según el tiempo de extracción, se evaluó si en cada tiempo dicha diferencia puede considerarse distinta de cero o no, mediante una prueba t.

Los análisis se realizaron mediante el programa R versión 3.3.0 (R Core Team, 2016).

Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para el estudio de la liberación ruminal de Se in vitro.

En la Figura 1 se muestra la evolución en el tiempo de la concentración de Se en JT y la concentración media en T1.

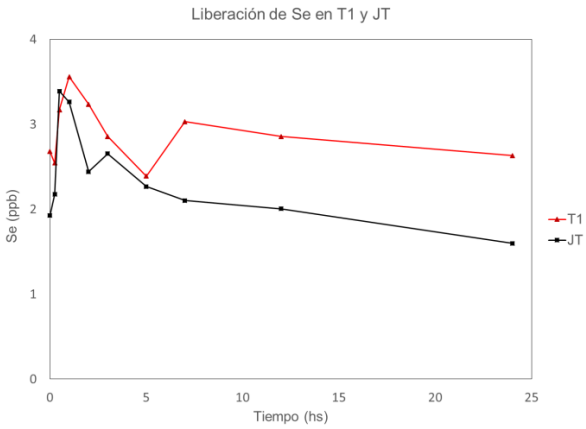


Figura 1. Liberación de selenio en la jarra testigo y el tratamiento 1 en función del tiempo. (T1> tratamiento 1: fluido ruminal + saliva artificial + alfalfa; JT> jarra testigo: saliva artificial + fluido ruminal)

Tiempo	Diferencia (ppb)	Valor t	P valor
0	0,749	2,48	0,0234*
0,25	0,369	1,22	0,2378
0,5	-0,220	-0,73	0,4770
1	0,297	0,98	0,3397
2	0,795	2,63	0,0171*
3	0,204	0,67	0,5086
5	0,123	0,41	0,6899
7	0,928	3,07	0,0066**
12	0,851	2,81	0,0115*
24	1,033	3,42	0,0031**

Tabla 1. Diferencias en el contenido medio de selenio entre el fluido ruminal del tratamiento 1 y la jarra testigo para cada tiempo de extracción. Valor de t y valor p correspondiente.

Puede verse en el gráfico que desde la hora 5 a la 7, en T1 hay un aumento de la concentración de Se que no se da en JT. A partir del análisis, se encontró que la diferencia en la concentración de Se entre T1 y JT cambia según el tiempo de extracción (p= 0,022). En la**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Tabla 1 se muestran dichas diferencias para cada tiempo de extracción y el valor p correspondiente a evaluar si la concentración media de Se en T1 difiere de la concentración de Se en JT, al comparar estas diferencias con cero.
De la comparación surge que la concentración media de Se en T1 difiere significativamente de la concentración de Se en JT a las horas 0 y 2, y a partir de la hora 7.
El análisis que se muestra en la Tabla 1, junto con el comportamiento observado en la Figura 1, evidencian que la diferencia entre JT y T1 es significativa a partir de la hora 7 hasta la 24. Dicho comportamiento podría relacionarse con la presencia de alfalfa y la liberación de Se a partir de ésta. Considerando esta situación, en la que las curvas de liberación de Se en FR con (T1) y sin alfalfa (JT) se diferencian luego de 7 hs, podría sugerirse que la liberación desde la alfalfa es progresiva en el tiempo. Algunos autores como Underwood y Suttle (2003) refuerzan esta idea, ya que indicaron que animales alimentados con forraje de mayor digestibilidad incurrían en problemas de deficiencia del mineral. También Suttle (2010) y Minson (1990) mencionan que las leguminosas, en general, tienen una menor disponibilidad de Se comparadas con las gramíneas lo cual podría relacionarse con que estas últimas, usualmente, poseen una menor digestibilidad. Así, un mayor tiempo de permanencia en el rumen aumentaría la proporción de Se liberado. Por el contrario, si el alimento sale del rumen rápido (mayor tasa de pasaje), lo hará con gran parte del Se unido a las proteínas bacterianas (hora 5 en la Figura 1) y este sería menos asimilable. En contraste, un alimento con baja digestibilidad y tasa de pasaje favorecería la liberación de Se desde el forraje.

Conclusión

Existen evidencias para concluir que la liberación de Se desde alfalfa fue progresiva en el tiempo y se dio a partir de las 7 hs de ensayo. En próximos ensayos sería conveniente agregar repeticiones a la jarra testigo para aportar evidencia estadística concreta sobre su liberación.

Bibliografía

DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. 2005. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. CABI. 746 p.
MINSON, D. J. 1990. Forage in Ruminant Nutrition. Academic Press, Inc. 483 p.
NOGUERA, R. R.; OCHOA, S. L. P. 2007. Modelación de la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 20(2):174-182.
PAGLIARICCI, H. R.; OHANIAN, A.; PEREYRA, T.; GONZALEZ, S. 2002. Utilización de pasturas. [en línea] Sitio argentino de producción animal. <https://es.scribd.com/document/199139642/08-Utilizacion-de-Pasturas> [consulta: 28/09/2017]: 1–28.
PAPPAS, A. C. E.; ZOIDIS, P. F.; SURAI, G. Z.2008. Selenoproteins and Maternal Nutrition. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 151(4): 361-372. http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.08.009.
R CORE TEAM. 2016. R: A language and environment for statistical computing: version 3.3.0. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/.
SURAI, P. F. 2006. Selenium in nutrition and health. Nottingham University Press, United Kingdom. 974 p.
SUTTLE, N.F. 2010. Mineral nutrition of livestock. In: Selenium. CAB International (4 ed). Pp. 377-425.
UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. 2003. Los minerales en la nutrición del Ganado. En: Selenio. Editorial Acribia, SA. Zaragoza, España (3 ed). Pp. 429-484.

IMPORTANCIA DE LA CALIDAD EN LA GESTIÓN DE LOS LABORATORIOS

Lic. Marcelo O. Pellegrino

La principal función de un laboratorio de ensayos es entregar resultados válidos y confiables en forma sistemática a lo largo del tiempo.
Este objetivo se logra a través de la implementación eficaz de un Sistema de Gestión de la Calidad basado en normas reconocidas.
Ello permite adaptar las prácticas y metodologías de trabajo a estándares nacionales, regionales o internacionales y demostrar ante terceros la competencia para ejecutar los ensayos.
Entre las múltiples ventajas de trabajar bajo un sistema de gestión de la calidad, se encuentran las siguientes:
permite cumplir en forma adecuada con los requisitos legales, reglamentarios y normativos vigentes y aumentar la satisfacción de los clientes.
genera confianza en los resultados analíticos emitidos
permite obtener resultados analíticos comparables a los de laboratorios reconocidos
otorga ventajas competitivas
permite mejorar continuamente la calidad de los servicios prestados
se toman decisiones basadas en cifras, datos y hechos
aumenta la competencia técnica del personal
se documentan los procesos y las actividades relevantes y,
permite detectar rápidamente los desvíos y tomar medidas para evitar que vuelvan a ocurrir

Hoy en día, los principales mercados internacionales exigen que los laboratorios que certifican la calidad e inocuidad de los productos y subproductos de origen animal y vegetal trabajen bajo un sistema de gestión de la calidad y estén acreditados.

HERRAMIENTAS ÚTILES PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE ISO/IEC 17025

Patricia Andrea Zimmer
Instituto Nacional de Tecnológica Agropecuaria (INTA)
Zimmer.patricia@inta.gob.ar

Para la implementación de sistemas de gestión de calidad (SGC) en laboratorios de ensayos y calibradores en nuestro país, se utiliza como Norma de referencia la IRAM ISO/IEC 17025 vigente. En ella se pueden encontrar los requisitos generales para la competencia de los laboratorios. Partiendo de que esta norma puede ser utilizada para que un laboratorio realice tanto aquellas actividades inherentes a la calidad como así también técnicas y administrativas, se convierte en un eje transversal para todas las acciones que se realicen en él.

A la hora de implementar dicha norma, encontramos un gran número de alternativas, que van desde asesoramientos personales con expertos en el tema, hasta la utilización de diferentes softwares desarrollados para tal fin. Más allá de la metodología seleccionada, se debe tener presente que lo que se busca es asegurar la calidad de los resultados de ensayos y/o calibraciones, para satisfacer los requerimientos del cliente.
Uno de los principales impedimentos para implementar SGC, es el desconocimiento acerca de cuáles son las ventajas y requisitos. En este sentido, la sensibilización del equipo de trabajo es una herramienta muy útil en las instancias iniciales. La misma se puede realizar a través de capacitaciones internas, reuniones de trabajo, visitas de responsables de calidad de otros laboratorios, acercando el “que debemos hacer” al “como lo hacemos en el laboratorio”, y así cumplir con los requisitos las normas vigentes.

La definición del organigrama del laboratorio, estableciendo las funciones y responsabilidades, contar con un responsable de calidad y el compromiso de la dirección es crucial para el desarrollo sostenido del SGC. La dirección técnica del laboratorio debe participar activamente en la definición de políticas de calidad, estrategias de intervención, planteo de objetivos a corto, mediano y largo plazo, así como también acompañar y autorizar el uso de recursos para las capacitaciones del personal y para establecer una correcta gestión de equipos (calibración, verificación y mantenimiento).

Los SGC una vez establecidos, deben tender a la mejora continua, nutriéndose de la información de retorno del cliente (encuestas, comunicaciones personales, quejas), de los resultados de las auditorias, de las revisiones por la dirección, utilizando la política de calidad y el planteo de objetivos.

Una herramienta útil y muy difundida para la mejora continua en SGC, es el Ciclo de Deming o ciclo de la mejora continua, descripto por William Edward Deming. Este ciclo contempla cuatro aspectos:

Planificar: Establecer la visón y misión, definir objetivos y establecer indicadores.
Hacer: Poner a prueba lo planificado.
Verificar :Evaluar si los objetivos planteados obtuvieron los efectos esperados utilizando los indicadores establecidos.
Actuar: Actuar en consecuencia a los resultados verificados, sustituir, modificar o reafirmar. A partir de aquí se re inicia el ciclo, dando lugar a la mejora continuar del SGC.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO EN EL LABORATORIO VETERINARIO DE QUÍMICA CLÍNICA

Diego F. Eiras
Comisión de Patología Clínica de la AAVLD
Laboratorio de Inmunoparasitología, Departamento de Epizootiología y Salud Pública, FCV, UNLP, 60 y 118, La Plata, Buenos Aires
Laboratorio DIAP (Diagnóstico en Animales Pequeños), Pueyrredón 1098, Banfield, Buenos Aires
diegoeiras@fcv.unlp.edu.ar

La calidad de las pruebas de un laboratorio depende del grado de adecuación del servicio a las necesidades y requisitos de los usuarios o clientes. El veterinario clínico no posee los conocimientos técnicos para discutir sobre el desempeño de un procedimiento de medida, por consiguiente, los veterinarios de laboratorio deben comprender las necesidades clínicas e interpretarlas en términos de desempeño analítico. Como requisito implícito en el sistema de calidad, esta es la principal responsabilidad del profesional de laboratorio.

Control de la Calidad

Se refiere a los procedimientos para efectuar un seguimiento de los procesos de trabajo, detectar problemas y realizar correcciones previas a la liberación de productos y servicios. A diferencia de un producto físico que puede ser inspeccionado para evaluar si luce bien o mal, no se puede decir si el resultado de una prueba es válido, ya que el producto de un proceso de análisis de química clínica de un laboratorio es un resultado numérico. El control estadístico de la calidad es un procedimiento de fundamental importancia para el seguimiento del desempeño analítico de los procesos de ensayo del laboratorio. Para la calidad analítica, los requisitos deberían estar destinados a brindar resultados correctos dentro de límites establecidos. Por ejemplo, si tenemos un control estable de creatinina que fue analizado muchas veces con anterioridad, en el que siempre se observaron valores entre 0.94 y 1.46 mg/dl, se espera que un nuevo valor medido caiga dentro de este rango si todo está funcionando adecuadamente (*e.g.* 1.35 mg/dl). Por consiguiente, es posible asumir que los resultados de los pacientes incluidos en la misma corrida analítica sean probablemente correctos. El **control interno** de la calidad refiere a un único laboratorio analizando controles como el descripto en el ejemplo para tomar decisiones internas sobre la aceptación o rechazo de las corridas analíticas brindando una buena estimación de la **precisión** del procedimiento de medida.

Control de calidad externo

Un esquema de **evaluación externa** de la calidad involucra a varios laboratorios analizando la misma muestra de control. Esto le permite a un laboratorio individual comparar su desempeño con el desempeño del grupo par. Un esquema de evaluación externa de la calidad es particularmente útil para estimar la **exactitud** de un procedimiento de medida. El **control de calidad externo** pone de manifiesto la inexactitud de cada laboratorio, la imprecisión del conjunto de laboratorios que participan, los cambios en la calidad a través del tiempo y la estabilidad de los materiales empleados. Posibilita realizar acciones correctivas de manera más objetiva.

Conceptos importantes

Matriz. Se refiere a la sustancia o base con la que se prepara el material de control junto con los aditivos. Idealmente, los materiales de control deberían tener la misma matriz que las muestras de los pacientes, para que se comporten como muestras reales y proporcionen información sobre lo que está ocurriendo con el procedimiento de medida durante los ensayos rutinarios.
Precisión. Indica el grado de concordancia entre varias mediciones individuales del mismo mensurando.
Exactitud. Indica la concordancia entre el valor medido y el valor verdadero.
Un instrumento puede ser muy preciso si al hacer varias mediciones arroja siempre resultados similares, pero inexacto si el resultado se encuentra lejos de la realidad (figura 1).
Error sistemático. Es aquel que se comporta siempre de la misma manera en todas las mediciones que se realizan en relación al valor verdadero.
Error aleatorio. Diferencia entre un resultado concreto de una medición y el resultado promedio de muchas mediciones del mismo mensurando (figura 2).

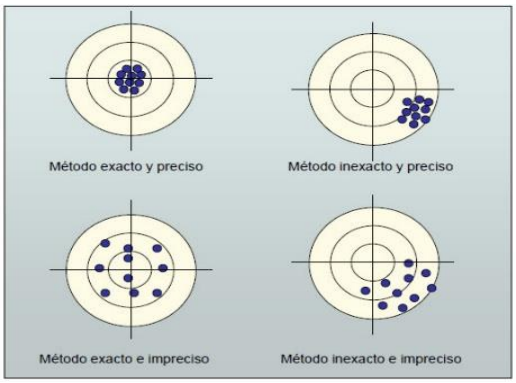


Figura 1. Relación entre precisión y exactitud en los procedimientos de medida.

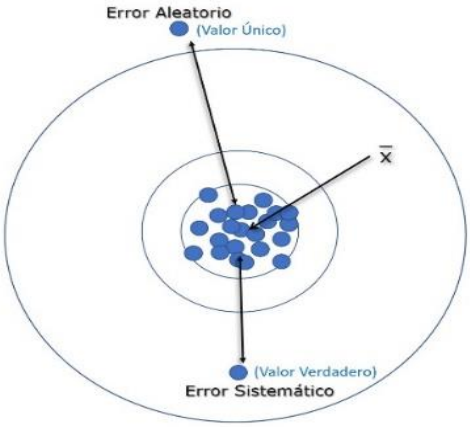


Figura 2. Diferencia entre error aleatorio y sistemático.

DIAGNÓSTICO DE DIARREA VIRAL BOVINA EN SUS DISTINTAS FORMAS DE PRESENTACIÓN.

Odeón, Anselmo Carlos
INTA, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce.
odeon.anselmo@inta.gob.ar

Introducción

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) se encuentra en la mayoría de los países con explotaciones de ganado bovino ocasionando importantes pérdidas económicas. Si bien la infección del VDVB generalmente pasa inadvertida, las manifestaciones clínicas que puede dar varían desde un cuadro diarreico leve, denominado "Diarrea Viral Bovina", hasta un síndrome fatal llamado "Enfermedad de las Mucosas". El VDVB también puede afectar la reproducción del ganado causando infertilidad, abortos, anomalías congénitas o el nacimiento de terneros persistentemente infectados con el virus. Debido a la variedad de las posibles manifestaciones del virus el diagnóstico DVB siempre resulta un reto para veterinarios y laboratoristas.
El VDVB pertenece a la familia Flaviviridae, género Pestivirus, es un virus envuelto, con genoma de ARN de cadena simple de 12,3 Kb. La proteína estructural más relevante es la glicoproteína E2 o gp53 que media el ingreso del virus a la célula e inicia la respuesta inmune. Entre las proteínas no estructurales, NS3 o p80, resulta de interés debido a que se expresa abundantemente durante la replicación viral y es altamente inmunogénica. Esto tiene implicancias prácticas en el diagnóstico ya que la detección de anticuerpos específicos contra NS3 permite identificar un proceso infeccioso y diferenciarlo de la respuesta inmune a vacunas inactivadas.
De acuerdo con su comportamiento en cultivos celulares el VDVB puede clasificarse en dos biotipos, no-citopatogénico (NCP) y citopatogénico (CP), siendo el VDVB NCP es el más frecuente en la naturaleza, mientras que biotipo CP es el producto de una mutación del VDVB NCP. A su vez, estudios del genoma viral permiten clasificar al VDVB en varios genotipos, resultando los Genotipos 1a y 1b los más prevalentes y los del Genotipo 2 los más virulentos. En nuestro país el genotipo que se identifica con mayor frecuencia es el Genotipo 1b. Si bien hay algunas diferencias en la inmunidad cruzada entre genotipos, no pueden clasificar serotipos del VDVB.

Diagnóstico

El diagnóstico de los cuadros clínicos del VDVB y detección de bovinos PI se basa en tres aspectos principales: detección del virus por aislamiento, identificación del ácido nucleico viral o la cuantificación de anticuerpos específicos (serología). Para ello se requieren laboratorios adecuadamente equipados y personal capacitado. Además de los métodos clásicos del laboratorio de virología (aislamiento viral, seroneutralización, etc.), existen técnicas con alta sensibilidad y especificidad (ELISA, rt-PCR, Real Time PCR, etc.) que facilitan el diagnóstico. No obstante, la interpretación de los resultados es fundamental para determinar la participación real del virus en un determinado problema sanitario. Por ejemplo, debido a la condición de infección endémica del VDVB, con elevada seroprevalencia en la población bovina, la simple detección de anticuerpos generalmente tiene poco valor diagnóstico.
El éxito del aislamiento viral depende de la calidad de la muestra, estando relacionada con las condiciones en que la misma fue obtenida (autólisis, contaminación, etc.) y la forma en que fue conservada y enviada al laboratorio. La mejor muestra es aquella que se obtiene de un animal afectado en la etapa inicial de la enfermedad (biopsias, hisopado, sangre), o de un animal enfermo necropsiado, evitando la contaminación y cambios *post mortem*.
Las muestras a obtener dependerán del cuadro clínico observado (ver tabla). Los especímenes deben ser colectados en forma aséptica, en envases con buen cierre e identificadas. Como la viabilidad viral es crucial para el aislamiento, deberían llegar al laboratorio dentro de las 24 hs. de haberse obtenido, enviándose refrigeradas (no congelar), con medio de trasporte adecuado (sol. fisiológica estéril, o medio de Hank´s). En caso de solicitar la prueba de PCR las muestras (tejido, sangre o fluidos) pueden congelarse.

Saneamiento

La identificación y eliminación de animales persistentemente infectados es esencial para controlar la DVB. Como estos animales no se pueden identificar clínicamente (generalmente son sanos), para su detección debe recurrirse a un laboratorio especializado. Diferentes métodos de diagnóstico de adecuada sensibilidad y especificidad están disponibles para la identificación bovinos PI.
Antes de proponer el saneamiento del VDVB en un establecimiento es importante definir los factores de riesgo y posible presencia de animales PI. No en todos rodeos en donde circula el virus hay animales PI. En caso de sospechar problemas sanitarios relacionados con el VDVB (abortos, nacimiento de terneros ciegos, con áreas de alopecia, signos neurológicos, enfermedad de las mucosas, etc.), inicialmente debería confirmarse la presencia del virus mediante el diagnóstico de laboratorio y evaluar riesgo epidemiológico de la infección en el establecimiento en base a sus características de producción y manejo.
En un plan de saneamiento de DVB se tiene que considerar: 1) el diagnóstico inicial (detección del virus como causa de problemas) y clasificación del riesgo sanitario del rodeo, 2) la detección de los bovinos PI en todo el rodeo y 3) una fase de vigilancia, dónde además de un plan de vacunación adecuado, se monitoreen las pariciones venideras, ingreso de bovinos, semen etc. para evitar la reintroducción del virus (ver esquema).
La factibilidad económica de una propuesta sanitaria resulta una consideración de importancia a la hora de proponer un programa de control.

Conclusiones

Actualmente en nuestro país el saneamiento del VDVB tiene aplicación limitada por la falta de conocimiento del problema y la disponibilidad de propuestas adecuadas. En tal sentido, resulta destacable disponer de tecnología competitiva que permita elevar la calidad del servicio sanitario en el mercado.

Muestras a obtener según el cuadro clínico y tipos de análisis para el diagnóstico de DVB

	Muestra	Remisión	Método	Observaciones
Diarrea Viral Bovina	Suero	Refrigerado	ELISA/SN	Pareado ± 3 semanas Seroconversión
	Leucocitos (sangre c/anticoag)		AV/ELISA/PCR Rec. Leucocitario	Leucopenia (h/10-12 días)
	Hisopado (nasal, ocular), semen etc.	Medio de transporte (refrigerado)	AV/ELISA/PCR	Viremia de 7– 1 días
Aborto	Órganos fetales (bazo, pulmón, SN)	Medio de transporte (refrigerado) Formol 10%	AV/PCR IHQ	
	Fluidos fetales	Refrigerado	SN/ELISA(?)	Anticuerpos indican inf. transplacentaria
	Suero hembra		ELISA/SN	Comparar “abortadas vs preñadas ”
Bovino PI	Suero	Refrigerado	ELISA Ac, Ag /SN/PCR/AV/ICr	En general seronegativos
	Leucocitos		ELISA Ag/PCR /AV	
	Biopsias (ej. piel)		ELISA Ag/PCR /AV	
	Hisopados nasales y oculares	Medio de transporte (refrigerado)	ELISA Ag/PCR /AV/ICr	
Enfermedad de las Mucosas	Bazo	Medio de transporte (refrigerado)	AV/PCR/ICr	
	Lengua, esófago, abomaso, intestino, linfonódulos y placas de Peyer	Formol 10%	Histopatología e IHQ	Erosiones mucosas Enteritis (“criptitis”) Necrosis linfoidea

SN: seroneutralización, AV: aislam. viral; ICr: inmunocromatografía; IHQ: inmunohistoquímica; Refrigerado, 4-8°C

PESTIVIRUS EMERGENTE HOBI: IMPACTO EN SALUD ANIMAL Y SU IMPORTANCIA COMO CONTAMINANTE DE INSUMOS BIOTECNOLÓGICOS

Pecora Andrea[1]
1-Instituto de Virología, CICVyA INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina.
pecora.andrea@inta.gob.ar

El virus HoBi es un pestivirus emergente que afecta al ganado bovino, caprino y bubalino y también es un contaminante común de productos biológicos. Se han reportado varios aislamientos del virus HoBi en Brasil, Italia, Bangladesh, China y Tailandia, tanto a partir de casos clínicos como de líneas celulares y suero fetal bovino (SFB) no-irradiado (Shi et al., 2018). Este patógeno ha estado involucrado en cuadros respiratorios, abortos y en la generación de animales persistentemente infectados. Las presentaciones clínicas generadas por el virus HoBi pueden confundirse con el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), por lo cual no hay estimaciones sobre su impacto en los rodeos. Desde el punto de vista del diagnóstico, se ha comprobado que algunas técnicas moleculares diseñadas para detectar pestivirus no son capaces de detectar al virus Hobi (Bauermann et al., 2013). En cuanto a las herramientas profilácticas, no hay actualmente vacunas que contengan antígeno de este virus. Asimismo, se ha demostrado que el virus Hobi es antigénicamente diferente a los VDVB-1 y VDVB-2 (Decaro et al., 2013).
El único país sudamericano con información sobre la circulación del virus HoBi era Brasil, en donde este pestivirus es endémico y el más prevalente en la región del noreste (Silveira et al., 2017). En este aspecto, en el Instituto de Virología de INTA Castelar, hemos abordado una línea de investigación para determinar la presencia del virus HoBi utilizando dos estrategias distintas: 1- Estudios de serología comparativa a partir de muestras de rodeos bubalinos del NEA. 2- Análisis de lotes semielaborados de SFB nacionales.
Con el primer abordaje, analizamos mediante seroneutralización viral muestras de sueros bubalinos de 12 establecimientos de Chaco, Corrientes y Formosa y pudimos evidenciar la circulación del pestivirus HoBi en rodeos mixtos (bovino-búfalo) de la provincia Corrientes, ya que encontramos animales con altos títulos de anticuerpos neutralizantes para este pestivirus. Estos animales no habían recibido vacunaciones contra el complejo respiratorio y reproductivo bovino y no contenían títulos de anticuerpos significantes contra VDVB-1 y 2 (Pecora et al., 2017).
Con la segunda estrategia, pudimos detectar por RT-PCR 46 pestivirus a partir de lotes de SFB no irradiados provenientes de frigoríficos de la provincia de Buenos Aires. Los estudios filogenéticos mostraron que las secuencias nucleotídicas de 4 de esas muestras se agrupaban con el virus HoBi. A través de pasajes celulares, fue posible aislar a estos agentes, que fueron utilizados para formular vacunas experimentales e inducir la producción de anticuerpos en el modelo cobayo. Finalmente, los cobayos vacunados generaron anticuerpos con capacidad neutralizante específica contra una cepa de referencia de virus HoBi. De este modo, pudimos evidenciar que este virus está circulando en rodeos ubicados en la Provincia de Buenos Aires.
El creciente número de reportes del virus HoBi plantea dos preocupaciones principales: una relacionada con la aparición y propagación del patógeno, con consecuencias en la salud animal y el control de enfermedades. La segunda preocupación se relaciona con la contaminación de los lotes de SFB, con implicaciones para la bioseguridad de los productos biológicos que lo contienen, como vacunas, reactivos de diagnóstico, kits y otros productos de la bioindustria. Los laboratorios de diagnóstico veterinario y las empresas de productos biológicos deben tener en cuenta que, utilizando únicamente kits diseñados para

VDVB, puede haber un alto porcentaje de subdiagnósticos, lo que puede dar lugar a la diseminación del virus y potenciales pérdidas económicas.

NUEVAS TECNOLOGIAS EN EL DIAGNOSTICO VETERINARIO

María José Dus Santos[1,2].
Instituto de Virología, CICVyA, INTA.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

El advenimiento de las nuevas tecnologías en el ámbito de las ciencias de la sanidad animal ha posibilitado el desarrollo de métodos para detectar, caracterizar y controlar con éxito las enfermedades de interés veterinario. Bajo la concepción de "un mundo, una salud", los efectos de tales innovaciones exceden la influencia en la sanidad y el bienestar de los animales y contribuyen, también, a mejorar la salud humana y la seguridad alimentaria.
La intensificación de la producción ganadera y agrícola ha llevado a la utilización masiva de agentes bactericidas y bacteriostáticos, especialmente antibióticos, con el objetivo de mantener las condiciones sanitarias y los niveles productivos. En el contexto actual, en el cual se tiende a reducir el uso de antibióticos, los avances tecnológicos en el diagnóstico y la vacunación constituyen elementos claves para tal fin.
Los progresos de la Ingeniería genética en los últimos años han provocado una verdadera revolución en el campo del seguimiento epidemiológico y de la fabricación de nuevos medicamentos, diagnósticos y vacunas. En general, y por razones económicas, las tecnologías aplicadas a gran escala en los campos de la prevención veterinaria, siguen de cerca, pero un paso por detrás, los avances realizados en la medicina humana.
Con estas tecnologías nos adentramos en una nueva era del conocimiento de las enfermedades, en la que es posible obtener nueva información y lograr un mayor nivel de predictibilidad, lo que puede traducirse en una respuesta más rápida y un control más eficaz ante crisis sanitarias potencialmente devastadoras. Los métodos innovadores de diagnóstico pueden, entonces, cumplir una importante función en la detección de enfermedades infecciosas nuevas y emergentes en la interfaz entre animales, personas y medio ambiente. No menos importante, es poseer la capacidad de dirigir estratégicamente su aplicación con el fin de optimizar sus efectos sobre la salud mundial, la seguridad del comercio internacional de animales y de productos de origen animal, el bienestar de los animales y la seguridad alimentaria.
Dentro del diagnóstico, los inmunoensayos y el diagnóstico molecular son las áreas donde más han influido los avances biotecnológicos. La versatilidad de distintas plataformas para la producción de antígenos y la obtención de anticuerpos específicos sin la inmunización de animales han transformado los inmunoensayos. Con la incorporación de herramientas biotecnológicas, además de mejorar la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico, se persiguen dos objetivos principales: en primer lugar, la detección múltiple de analitos (antígenos o anticuerpos) en un solo ensayo utilizando poco volumen de muestra. En segundo lugar, hoy en día son cada vez más demandadas las técnicas diagnósticas que puedan realizarse fácilmente y en el sitio donde se localiza el problema, dando lugar a lo que se conoce como ensayos "*Portable, On-site, Pen-side o Point-of-care*".
El desarrollo de las técnicas que analizan los ácidos nucleicos, supuso un gran avance en los últimos años del siglo XX. En particular, las técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han revolucionado el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Son sensibles, específicas, rápidas y robustas y, además permiten su robotización y automatización, lo que facilita el análisis de un número elevado de muestras. Son de especial utilidad para la detección de agentes patógenos de difícil aislamiento o crecimiento lento y en casos de infecciones crónicas o persistentes. Estas técnicas incluyen los ensayos de hibridación, microarrays y todas las variantes de la PCR (de punto final, en tiempo real e isotérmicas). Asimismo, en los últimos años han avanzado enormemente los métodos robotizados de secuenciación masiva, unidos a los desarrollos bioinformáticos para la gestión de la información generada, lo que ha permitido aumentar el número, así como el tamaño, de secuencias que se pueden analizar. La epidemiología molecular basada en la secuenciación de genomas completos y la metagenómica han permitido la rápida identificación de diversos patógenos conocidos y el descubrimiento de nuevos y desconocidos.
Existe una clara tendencia en las últimas décadas de reemplazar parcial o totalmente a las metodologías convencionales por las moleculares; sin embargo, es la combinación de ambas lo que asegura la mejor capacidad diagnóstica. Para lograr el impacto deseado, es importante no solo promover la aparición de nuevas tecnologías que puedan responder a los problemas sanitarios actuales y futuros, sino también asegurarse de que la praxis y las normas zoosanitarias vigentes integren esas nuevas tecnologías aprovechando todas las posibilidades que ofrecen.

RESÚMENES
DE
TRABAJOS CIENTÍFICOS

BACTERIOLOGÍA

B1- HISTOFILOSIS NERVIOSA EN VAQUILLONA: REPORTE DE UN CASO Y APLICACIÓN DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E INMUNOHISTOQUÍMICA

G. Cantón[1*], M.A. Fiorentino[1], E. Morrell[1], E. Fernández[1], P. Feula[2], E. Odriozola[1], D. O´Toole[3].
[1]INTA, EEA Balcarce. [2]Actividad privada. [3]University of Wyoming. *canton.german@inta.gob.ar

Introducción

Histophilus somni es una bacteria que afecta a rumiantes provocando diferentes cuadros clínicos que incluyen desde procesos febriles sin mucha más signología evidente, neumonías, cuadros neurológicos y abortos, entre otros. La enfermedad neurológica puede manifestarse patológicamente como una meningoencefalitis trombótica (MET) o una meningitis supurativa. Muy probablemente la histofilosis muchas veces quede subdiagnosticada clínicamente en situaciones de campo. Tradicionalmente el aislamiento bacteriano es la metodología diagnóstica de elección, sin embargo no existen medios selectivos para *H. somni* y eso sumado a su crecimiento lento hace muchas veces difícil su identificación en muestras contaminadas. Hoy en día existen nuevas técnicas que posibilitan la identificación de *H. somni* bajo circunstancias en las que no es posible realizar el cultivo. El objetivo de este trabajo es hacer la descripción de un caso de histofilosis nerviosa diagnosticado por el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) del INTA Balcarce, utilizando técnicas de diagnóstico no tradicionales para esta enfermedad.

Materiales y métodos

El caso ocurrió en un rodeo de 254 vaquillonas Hereford de 2 años de edad ubicado en Río Turbio (51°06'03"S 72°11'10"O), provincia de Santa Cruz. Los animales se encontraban bajo un protocolo de sincronización de celo para inseminación artificial. Posterior al segundo tratamiento hormonal, murieron 4 animales en un periodo de 3 días. Al cuarto día apareció otra vaquillona que caminaba con dificultad, demostrando desplazamiento hacia lateral, posteriormente permaneció en decúbito y se procedió a realizar eutanasia y necropsia. Durante la misma se recolectaron muestras de sistema nervioso central (SNC) en formol tamponado al 10% para realizar estudios histopatológicos de rutina. Además, el tejido cerebral formolado se observó bajo luz ultravioleta (365 nm) para descartar Polioencefalomalacia de origen nutricional. Sobre los tejidos donde se observaron lesiones a la histología se realizó inmunohistoquímica (IHQ) para *H. somni*, empleando un anticuerpo primario policlonal y el método de avidin/biotina/peroxidasa (Vector Labs Inc, USA) de acuerdo a lo descripto por Gogolewski et al. (1987). Se extrajo ADN de muestras de SNC embebidas en parafina utilizando el kit comercial QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo las especificaciones del fabricante. El extracto de ADN fue almacenado a -20°C hasta su uso. Para la detección del gen 16S rRNA de *H. somni* se utilizó la PCR descripta por Saunders et al. (2007) con modificaciones. Además, se remitieron muestras de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de 2 animales afectados (incluido el animal necropsiado) para cuantificar Ca, Na, Mg por espectrofotometría de absorción atómica (EEA), P y proteínas totales por espectrofotometría UV-Vis.

Resultados

En la necropsia, se observaron múltiples focos de entre 0,5 y 1,0 cm de diámetro de coloración rojiza, distribuidos aleatoriamente en la corteza y el tallo encefálico. El resto de los tejidos inspeccionados no presentaron lesiones aparentes. En el análisis histopatológico se corroboró una meningoencefalitis y mielitis multifocal necrosupurativa con trombosis severa. En estos tejidos la immunomarcación fue positiva para *H. somni*, detectando la bacteria principalmente en forma de agregados en capilares y venas. Se amplificó por PCR un producto de 319pb coincidente con el gen 16S rRNA específico de *H. somni*. No se detectó autofluorescencia compatible con PEM. La concentración sérica de Ca, P, Mg y Na y la concentración de Mg y Na en LCR estaban dentro de los parámetros de referencia, descartando una deficiencia mineral con clínica compatible con la manifestada por los animales. En cambio, la concentración de proteínas totales en LCR en ambos animales presentaba valores de 3,18 y 0,98 g/100ml, respectivamente (rango de referencia: 0,02- 0,03 g/100ml), que suele observarse en alteraciones patológicas que involucren daño meníngeo.

Discusión y conclusión

Estos hallazgos confirman que la vaquillona necropsiada, de la cual se extrajeron muestras, sufrió un cuadro de histofilosis nerviosa que ocasionó su muerte. Aunque no se pudo determinar la causa de las otras muertes registradas, teniendo en cuenta que la signología descripta en el animal necropsiado fue similar a la observada en los otros casos, podría presumirse que todos los animales sufrieron la misma patología. Además, se descartaron otras posibles patologías que podrían estar afectando al animal aunque, lamentablemente no se remitieron muestras de tejido para intentar aislamiento viral.

La MET es una de las manifestaciones clínico-patológicas de la infección con *H. somni*, caracterizada como una enfermedad aguda y fatal que puede afectar a bovinos y ovinos. *H. somni* es un habitante normal del tracto genital y respiratorio, que bajo determinadas condiciones puede cruzar la barrera hematoencefálica y afectar mayormente a los vasos encefálicos. La trombosis vascular es un hallazgo característico de *H. somni*, ya que la bacteria produce la disrupción de las células endoteliales con la consiguiente activación de los mecanismos de coagulación y formación del trombo. La MET se presenta de manera esporádica y no se comporta como una enfermedad contagiosa. Los animales afectados demuestran depresión severa, estado comatoso, fiebre, ataxia, incoordinación y párpados caídos (síndrome de ensueño). En sistemas de pastoreo, lo más frecuente es encontrar los animales muertos, sin apreciar las manifestaciones clínicas debido al curso agudo de la enfermedad. *H. somni* es sensible a la mayoría de los antibióticos utilizados en la rutina, pero para que el tratamiento sea efectivo es imprescindible que el mismo se realice al inicio del cuadro clínico y que la droga de elección atraviese la barrera hematoencefálica. Está demostrado que la bacterina que se encuentra comercialmente disponible no previene la infección, pero es probable que disminuya la severidad de la presentación nerviosa. Si bien la MET por *H. somni* está descripta en la bibliografía internacional, no existen muchos reportes de esta presentación clínica en rodeos locales. Esto se deba a que posiblemente, como se mencionó previamente, la detección de estos animales afectados y la remisión de muestras sea dificultosa. Además, de rutina suelen enviarse tejidos frescos para intentar aislamiento, y si las condiciones no son las ideales (como en este caso, donde la distancia entre la ubicación del predio afectado y el laboratorio de diagnóstico es de 2500kms) o se haya intentado un tratamiento con antibióticos, nos encontraremos con las limitantes antes descriptas. En este trabajo, se emplearon 2 nuevas técnicas de diagnóstico a partir de tejido fijado, las mismas permitieron arribar al diagnóstico ante una situación en la que no era posible realizar el cultivo. Sin dudas este tipo de técnicas constituyen herramientas útiles en este tipo de cuadros clínicos.

Bibliografía

-Descarga et al. 2002. Vet Rec 150:817-817.
-Gogolewski et al. 1987. Vet Pathol 24:250-256.
-O'Toole y Sondgeroth 2015. Curr Top Microbiol Immunol 396:15-48.
-Saunders et al. 2007. Aust Vet J 85:72-77.

B2- BÚSQUEDA DE *SALMONELLA ENTERICA* EN PERROS CON Y SIN DIARREA DE LA PROVINCIA DE SANTA FE

[1]CL Pidone; [3]MI Caffer; [1]ME Luciani; [1]MJ Adrien Rüegger; [1]EH Nicolino; [1]EA Liguori; [1]ML Gorordo; [2]ER Comba. Cátedras de [1]Enfermedades Infecciosas y [2]Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Avda. Ovidio Lagos y Ruta 33, (2170) Casilda, Santa Fe. [3]Servicio Enterobacterias, I.N.E.I., A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán". E-mail: cpidone@fveter.unr.edu.ar

Introducción

La salmonelosis puede afectar a un sinnúmero de especies y es muy común en animales domésticos: aves de corral, cerdos, bovinos y equinos, aunque es menos frecuente en caninos y felinos. Los animales contraen la enfermedad comúnmente al ingerir agua de bebida contaminada, alimentos de origen animal crudos y también por contacto directo con las heces de animales infectados (5). En humanos son frecuentes los casos de gastroenteritis provocados por distintas cepas de *Salmonella*, la mayor parte de las veces debido al consumo de alimentos contaminados. No es raro aislar a esta bacteria a partir de distintos productos de origen animal. El hombre también puede adquirir la infección y enfermar, razón por la cual es considerada una zoonosis (4). Muchos perros y gatos son portadores asintomáticos de *Salmonella*. En estas especies la enfermedad clínica es rara, pero, cuando ocurre, se asocia a menudo a otras infecciones o a enfermedades debilitantes en adultos y a exposición a concentraciones elevadas de la bacteria en cachorros y gatitos (2). En perros se han aislado numerosos serovares de *Salmonella*. *S.* Typhimurium, por ejemplo, se aisló de perros en muchos países y parece tener una distribución mundial (5).

En el marco de un estudio epidemiológico más amplio, se recolectaron muestras de materia fecal de perros de distintas localidades del sur de Santa Fe, con el objetivo de detectar en ellas algunas serovariedades de *Salmonella enterica*.

Materiales y métodos

Se recolectaron muestras de materia fecal de 90 perros, 28 de ellos con signos de diarrea en principio no atribuibles a salmonelosis, y el resto a partir de animales asintomáticos. Los perros se muestrearon en clínicas veterinarias privadas: 29 provinieron de la localidad de Soldini, 22 de Carcarañá, 12 de Casilda, 6 de Rosario, 2 de Capitán Bermúdez, 1 de San Jerónimo Sur y 1 de Granadero Baigorria. Todas poblaciones de la provincia de Santa Fe, Argentina. Los hisopos con la materia fecal se colocaron en medio de transporte de Stuart y se conservaron a 4º C hasta su procesamiento, que se realizó 24 horas después. Cada una de las muestras obtenidas se sembró en tubos que contenían 10 ml de caldo Tetrationato base de Muller-Kauffmann y se incubaron a 43º C en baño de María durante 24 horas (3). Posteriormente, con un ansa de siembra se tomó una alícuota de la superficie de cada una de los tubos y se sembraron en agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD), incubándose durante 24-48 horas a 37 °C. Las colonias sospechosas de ser *Salmonella* (rojas con centro negro) se identificaron utilizando pruebas bioquímicas convencionales tales como: agar TSI, pruebas IMViC, ONPG, y ureasa (1). Finalmente, se realizó una prueba de sensibilidad a antibióticos mediante el método de Kirby-Bauer, con discos de papel con concentración media de antibióticos (Laboratorio Britania S.A, CABA, Argentina).

Resultados

Todas las muestras resultaron negativas, con excepción de una correspondiente a un caniche con diarrea procedente de la localidad de Soldini, a partir de la cual se aisló *Salmonella*. El animal presentaba materia fecal pastosa oscura y murió poco tiempo después de habérsele tomado la muestra. La serotipificación se realizó, según el Esquema de White-Kauffmann-La Minor, en el Servicio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (I.N.E.I.) - A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán", siendo identificada como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. El resultado del antibiograma realizado a la bacteria aislada fue el siguiente: sensible a enrofloxacina, fosfomicina, imipenem, ciprofloxacina y amoxicilina; resistente a tetraciclina y cloranfenicol.

Discusión

En el hombre, la infección por *Salmonella* tiene frecuentemente un origen alimentario (1), pero dado que perros y gatos pueden también ser fuente de infección para humanos, principalmente para niños, debido a su tendencia de llevarse indiscriminadamente cosas a la boca (5), es importante tener en cuenta a esta zoonosis en el diagnóstico diferencial.

Los agentes infecciosos que pueden provocar cuadros digestivos en perros incluyen *Parvovirus* canino, virus del moquillo, *Coronavirus*, virus de la hepatitis infecciosa canina y bacterias como *Salmonella* y *Leptospira*. Los resultados de este estudio parecen estar acordes a la baja prevalencia de infección por *Salmonella* que se describe para esta especie (2). Sin embargo, esta infección en perros podría muchas veces no diagnosticarse, ya que la tasa de excreción de *Salmonella* a partir de las heces de perros asintomáticos es baja y puede variar entre un 0 a un 43 %; además, suele ser intermitente (5).

En el caso clínico descripto se desconoce la fuente de infección, pero ésta puede ser muy variada, y en general se da por alimentos de mala calidad o incluso por devorar animales salvajes, como ratas o ratones (5).

Conclusiones

Se concluye destacándose el aislamiento de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a partir de un perro con diarrea, lo cual implica un riesgo de infección para el hombre y para otros animales.

Bibliografía

1-Caffer, M.I; Terragno, R.; Binsztein, N. 2007. Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp.
En:http://bvs.panalimentos.org/local/File/Manual_Salmonella_1-02-07.pdf. Último acceso: abril 2018.

2- Manual Merk de Veterinaria. 2007. Editorial Océano, Sexta edición, p 152-153.

3- Manual Oxoid. 2006. 9th Edition. Compiled by E. Y. Bridson (substantially revised). Former Technical Director of Oxoid. 9th Edition: 196-197.

4-Noseda, R.P.; Bigalli, M.C.; Andrich, M.G.; Cordeviola, J.M.; Bardon, J.C.; Martinez, A.H.; Combessies, G.M. 2002. Aislamiento de Salmonella en muestras clínicas humanas, animales y alimentos, durante 1988-2001. Vet. Arg. Vol. XIX Nº:190.

-Wray C. and Wray A. 2000. Salmonella in Domestic Animals. CABI Publishing.

B3- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA DETECCIÓN IN VITRO DE IFN GAMMA BOVINO

LM Villafañe[1], O Zabal[2], CL Vázquez, F Bigi[1], MA Forrellad[1]
[1]Instituto de Biotecnología, [2]Instituto de Virología, CICVyA, INTA, Buenos Aires, Argentina.
villafanie.luciana@inta.gob.ar

Introducción

La tuberculosis bovina (TBB) es una de las principales enfermedades zoonóticas en nuestro país que causa grandes pérdidas económicas. SENASA emplea un control de erradicación de TBB basado en la prueba cutánea de tuberculina o intradermorreacción (IDR); sin embargo, varios países utilizan una técnica de ELISA indirecta alternativa y complementaria basada en la detección de IFNɣ. El objetivo de este trabajo es obtener anticuerpos monoclonales anti-IFNɣ bovino (mAb) que puedan utilizarse para el desarrollo de un ELISA de producción nacional para emplearse en el diagnóstico de TBB.

Materiales y métodos

1- Expresión y purificación de interferón gamma bovino recombinante (rboIFNɣ). El gen *ifnɣ* fue amplificado a partir de DNA copia (cDNA) obtenido del RNA total de células del sistema inmune de bovino, clonado en el vector de expresión pGEX-6P1, que permite la expresión de INFɣ fusionada a glutatión-s-transferasa (GST) y sobreexpresado en *E. coli* BL21-AI. La proteína rboIFNɣ fue purificada empleando *Glutathione Sepharose 4B* y luego se escindió la fusión GST *con PreScission Protease* (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante. 2- *Inmunización y producción de hibridomas*. Ratones BALB/c hembras de 12 semanas de edad fueron inmunizados con rboIFNɣ. Las células de bazo de los ratones se fusionaron con la línea celular de mieloma NS0 murino usando polietilenglicol 4000 (Gustafsson 1990) siguiendo el método de Milstein. Las células fusionadas se cultivaron en placas de 24 pocillos y de 96 pocillos en medio de selección HAT (RPMI, suero bovino fetal al 15%, hipoxantina aminopterina y timidina, HAT) a 37°C en estufa con 5% de CO_2. *3- Detección de células productoras de anticuerpos contra IFNɣ mediante ELISA indirecto*. El sobrenadante de cultivo de los hibridomas fue testeado por ELISA indirecto como describe Wood (1990). Se empleó rboIFNɣ como antígeno (Ag), absorbido a placas Maxisorp (Nunc), y el sobrenadante de los hibridomas como anticuerpo (Ac) primario. Se reveló con anti-IgG mouse conjugado a peroxidasa (HRP) utilizando los sustratos 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en buffer citrato 0,1M a pH 5 y se determinó la absorbancia a 405nm. *4- Detección de células productoras de anticuerpos contra IFNɣ mediante screening in situ*. Se empleó el método descrito por Orii (2013) con modificaciones. Se emplearon discos de nitrocelulosa esterilizados en los que se absorbió rboIFNɣ y en los cuales se hicieron marcas asimétricas para luego identificar la ubicación de los spots. Los discos se colocaron sobre las células en cultivo en placas de 24 pocillos, previamente se agregaron 100µl de medio fresco a cada pocillo, y se incubaron en estufa con 5% de CO_2 a 37°C durante 4 horas. Se hicieron marcas en la parte inferior de los pocillos equivalente a las marcas en el disco. Luego los discos se lavaron con buffer PBS 0,5% Tween y se incubaron con anticuerpo anti-IgG mouse*fosfatasa alcalina y se reveló con los sustratos BCIP/NBT. Producto de la reacción Ag-Ac, se produjeron spots en los discos que permitieron ubicar las células productoras para ser subclonadas por dilución limitante.

5- Purificación de mAb: Los mAb fueron purificados del sobrenadante de los cultivos por cromatografía de afinidad a Proteína A siguiendo las indicaciones del fabricante. 6- *Isotipado de mAb:* Se empleó el kit *Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents* (ISO2 Sigma) en ELISA de captura según las indicaciones del fabricante a fin de determinar el tipo (IgG, IgM) y subtipo (IgG1-3) de los mAb.

7- Análisis de la reactividad de los mAb anti-rboIFNɣ. Se determinó la especificidad relativa de los mAb por ELISA indirecto utilizando los antígenos rboIFNɣ, rboIFNɣ-GST y la proteína GST como control de cross-reactividad. Se ensayaron diferentes diluciones de los mAb purificados como Ac primario y anti-IgG conjugado a HRP como Ac secundario. Para el revelado se empleó ABTS/H_2O_2 en buffer citrato 0,1M a pH 5, y se determinó la absorbancia a 405nm.

Resultados

Clonado y estabilidad de los hibridomas. A partir del método de *screening in situ* se alcanzó un máximo del 96% (en promedio) de clones positivos, productores de Ac anti-IFNɣ luego de una primera ronda de subclonado. Realizando la selección empleando sólo el método ELISA indirecto se obtuvo el 3% de hibridomas positivos con una variabilidad marcada en su inestabilidad de producción, tornándose negativos en la primera etapa de subclonado. El empleo de ambos métodos, ELISA indirecto y *screening in situ,* incrementó la probabilidad de seleccionar hibridomas con producción de Ac que permanecieron estables durante los sucesivos ciclos de subclonado.

En cada ronda de subclonado, los valores de DO relativa de cada pocillo se calcularon frente a la DO del control negativo (*fold change*). Se obtuvieron al menos tres hibridomas positivos, siendo, el denominado E5F8P6, estable hasta la quinta ronda de subclonado. El valor medio de *fold change* obtenido fue 4,271 con un máximo de 6,396, obteniéndose el 100% de los pocillos positivos.

Isotipado de mAb. Se pudo determinar que el tipo de Ac producido por E5F8P6 es IgM, mientras que los hibridomas alternativos presentaron mezclas de tipo (IgG/IgM) e isotipo (IgG1/IgG2) de Ac.

Reactividad de los mAb anti-rboIFNɣ. Los Ac producidos por el hibridoma E5F8P6 muestran una elevada afinidad por rboIFNɣ y no presentaron cross-reactividad a la proteína GST. Sin embargo, presentan reactividad con la proteína de fusión rboIFNɣ-GST, con menor sensibilidad que lo observado respecto a la proteína rboIFNɣ libre, lo que sugiere que GST podría interferir en el reconocimiento Ag-Ac, por algún impedimento estérico que oculta epítopes del antígeno.

Conclusión

El mejor método para la selección de células productoras de mAb es el que permite la detección de Ac mediante *screening in situ,* puesto que garantiza la obtención de uno o más clones al seleccionarse un cúmulo de células mayormente productoras.

Se obtuvo un clon celular, E5F8P6, estable y productor de mAb anti-rboIFNɣ que no presentó cross-reactividad con otras proteínas.

En base a los resultados obtenidos se pretende utilizar este mAb en el desarrollo de un kit ELISA de captura para la detección de IFNɣ bovino, como prueba paralela a la clásica IDR en el diagnóstico de TBB.

Bibliografía

Gustafsson, B. Animal Cell Culture 1990; Wood, P. et al. Imrnunopathology Elsevier Science Publishers 1990; Orii, H et al. Analytical Biochemistry 2013; Höglind, A. et al. Journal of Immunological Methods 2017

B4- ESTUDIO RETROSPECTIVO PARA DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORES DE B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y RESISTENTES A COLISTINA AISLADOS DE ANIMALES PARA CONSUMO HUMANO Y MASCOTAS DE ARGENTINA

F Moredo, F Vinocur, V Nievas, F Pantozzi, M Ibar, G Giacoboni
Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Calle 60 y 118 (CC296), CP 1900, La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.
fmoredo@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

La aparición y la prevalencia *Escherichia coli* productores de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y resistentes a colistina en animales para consumo humano es una preocupación de la salud pública a nivel mundial. El contacto directo entre el hombre y los animales que eliminan bacterias portadoras de genes de resistencia antimicrobiana, el medio ambiente contaminado y el consumo de alimentos (o piensos) contaminados, incluido el agua, podría favorecer su diseminación. Si bien varios estudios informaron la transferencia de bacterias resistentes entre animales de producción para consumo y humanos, la contribución de los animales de compañía a este escenario no está clara. Se cree que las mascotas juegan un papel importante en la epidemiología de la resistencia a los antimicrobianos, debido a su contacto cercano con los humanos frecuentemente expuestos a tratamientos antimicrobianos. En medicina veterinaria, las cefalosporinas de tercera generación y la colistina se utilizan con fines profilácticos o metafilácticos en pollos y cerdos. En Argentina, las cefalosporinas de tercera generación se emplean para tratar enfermedades respiratorias y enfermedades intestinales y la colistina para prevenir infecciones por enterobacterias. Las cefalosporinas de espectro extendido registradas para humanos, de venta libre, son las mismas que se utilizan con fines terapéuticos en mascotas. El gen bla_{CTX-M} que codifica BLEE, es el descripto con mayor frecuencia en bacilos gramnegativos. Recientemente, se informó la presencia de un gen móvil de resistencia a colistina (*mcr-1*) localizado en plásmidos transferibles en varias especies bacterianas de animales, humanos y muestras ambientales.

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio retrospectivo para determinar el estado de situación respecto de la presencia de BLEE y resistencia a colistina en *E. coli* aislados de animales para consumo humano y mascotas desde 2004 hasta 2016.

Materiales y métodos

Se estudió un total de 282 *E. coli* aislados de animales para consumo (pollos parrilleros, gallinas ponedoras y bovinos) y 52 *E. coli* de mascotas (perros y gatos) entre los años 2004 y 2016 de diferentes provincias de la República Argentina, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Microbiología de la FCV, UNLP, obtenidos como parte de monitoreos de resistencia antimicrobiana y otros proyectos de investigación. Los *E. coli* se descongelaron en 2 ml de agua peptona tamponada y se incubaron durante la noche a 37 °C. Como tamizaje de resistencia, se repicaron 30 µl de cada cultivo enriquecido en agar Mac Conkey adicionado con 4 µg/ml de cefotaxima (MC-CTX) y en agar Mac Conkey adicionado con 2 µg/ml de colistina (MC-COL). Para continuar con el estudio, se seleccionó una colonia por placa y se repicó en ATS. A los aislamientos que desarrollaron en MC-CTX y MC-COL se les determinó la sensibilidad antimicrobiana frente a β-lactámicos y colistina según la 27ª ed del CLSI-M100S. El fenotipo BLEE y la posible resistencia a colistina se determinó según el "Protocolo de trabajo Red Whonet Argentina". Con el método de difusión en agar se probaron los siguientes discos: amoxicilina/ác. clavulánico (20/10 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), cefoxitina (30 µg) and colistina (10 µg).

La detección de los genes bla_{CTX-M} y *mcr-1* se realizó utilizando la técnica de PCR, con protocolos previamente descriptos por otros autores.

Resultados

Los 334 aislamientos analizados fueron sensibles a cefoxitina, ertapenem e imipenen.

Se observó resistencia a cefotaxima en 44 *E. coli* provenientes de gallinas ponedoras y pollos parrilleros; 17 presentaron fenotipo BLEE. En cuanto a la caracterización genotípica, se detectó el gen bla_{CTX-M} en 28 de ellas (66%). Un aislamiento mostró ser resistente a cefotaxima, ceftazidima y amoxicilina/ác. clavulánico y negativo al gen bla_{CTX-M}.

No se observaron *E. coli* resistentes a colistina. Si bien hubo algunos aislamientos con diámetro de halo de inhibición entre 11 y 13 mm, la detección del gen *mcr-1* fue negativa.

Discusión y conclusión

Si bien existe bibliografía, a nivel nacional, de la presencia de *E. coli* productores de BLEE aislados de mascotas, bovinos y cerdos, no ocurre lo mismo con bacterias provenientes de pollos/gallinas. Entre las tres clases de BLEE (TEM, SHV, CTX-M), las tipo CTX-M son las más efectivas, en términos de promiscuidad y diseminación en diferentes contextos epidemiológicos, donde reemplazaron y superaron en número a otros tipos de BLEE. Aunque no está claro si *E. coli* productoras de BLEE representan una amenaza directa para la producción avícola, ciertamente lo hacen para la salud pública.

Respecto de la resistencia a colistina, nuestros resultados no coinciden con los encontrados por Dominguez y col. quienes informaron la presencia del gen *mcr-1* en *E. coli* de cepario, aislados de pollos parrilleros clínicamente sanos en el año 2013.

Recientemente, en noviembre de 2017, la Organización Mundial de la Salud publicó la guía sobre la utilización de antimicrobianos de importancia en medicina humana, en animales para consumo, recomendando la restricción completa de su uso ya sea con fines profilácticos, terapéuticos o promotores de crecimiento.

Bibliografía

-Dominguez JE y col. Rev Arg Microbiol. 2017;49:297-8.
- McGann P y col. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60:4420-1.
- Norizuki C y col. Jpn J Infect Dis. 2018;71:33-8.
- Rapoport M y col. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60:4412-3.
- WHO Guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals.

B5- UTILIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EN LECHE CAPRINA

R.V. Rocha [1], M.J. Marfil[1], .A.F. Macias[2], G.G. Magnano[2], E.E. Sticoti[2], M.N. Macio[2], M.O. Schneider[2], F. Bigi[1], M.E. Eirin[1], M.J. Zumárraga[1]

1- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Instituto de Biotecnología, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.
2- Departamento de Patología Animal, Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Córdoba, Argentina. zumarraga.martin@inta.gob.ar

Introducción

Mycobacterium bovis (*M. bovis*) es el agente causal de la tuberculosis bovina (TBB), enfermedad zoonótica que afecta a distintos hospedadores. La infección por *M. bovis* en el ganado caprino es menos frecuente que en el bovino, siendo su prevalencia variable según el año y la región en estudio (0,67-7,3%) (Underwood *et al*., 2002) (Herrera *et al*., 1997). En el año 2015, se demostró la existencia de lesiones compatibles con tuberculosis (LCT) en 51 cabras provenientes de 8 hatos de pequeños productores que habían resultado positivos a la prueba tuberculínica (Magnano *et al*., 2015). Las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permiten identificar la presencia de micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) como *M. bovis* y *Mycobacterium caprae* en distintos tipos de muestra incluyendo la leche. El objetivo de este trabajo fue detectar especies del CMT, a partir de muestras de leche de cabra, mediante PCR de punto final.

Materiales y métodos

Se estudiaron muestras de leche de 24 cabras reaccionantes a la prueba tuberculínica. Esas cabras habían sido faenadas, cultivados sus órganos y leche. Los 17 aislamientos obtenidos de tejidos fueron tipificados por *spoligotyping* (Magnano, 2015). Un volumen de 500µL de leche fue procesado mediante digestión enzimática con Proteinasa K y posterior extracción con solventes orgánicos (fenol / cloroformo / alcohol isoamílico) precipitando el ADN total con isopropanol en medio salino (Zumarraga *et al*., 2012). El ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop) y se evaluó su calidad según la relación A260/A280. Se emplearon 2 µL de ADN como templado en la reacción de PCR, con el fin de amplificar un fragmento de 448 pb de la secuencia Rv2807, presente en los miembros del CMT (Araújo *et al*., 2014). Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron por exposición a un transiluminador de luz UV, estimando el tamaño del fragmento amplificado por comparación con un marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder, Promega). Se calculó el Valor Predictivo Positivo (VPP) y Negativo (VPN) de la prueba considerando al cultivo como el estándar de oro del diagnóstico de la enfermedad.

Resultados

De un total de 24 muestras analizadas, 11 (45,8%) resultaron positivas por PCR para Rv2807, mientras que las 13 (54,2%) restantes resultaron negativas (tabla 1). Los cultivos de las leches resultaron negativos en todos los casos, sin embargo, en 6 de las 11 muestras que dieron PCR positiva, se confirmó la presencia de *M. bovis* por cultivo de los órganos y por *spoligotyping*. En todos los casos se obtuvo el espoligotipo SB0140, el más frecuente de las muestras analizadas de Argentina. Por otra parte, se detectaron LCT en 3 de los 5 animales con PCR de leche positiva y aislamiento de tejidos negativo; mientras que en los 2 animales restantes, tampoco se detectaron LCT indicando que podría tratarse de falsos positivos (tabla 1). El VPP y VPN de la prueba fue de 54,5% y 15,4% respectivamente.

PCR en leche	Presencia de LCT	Cultivo de tejidos	Total
Positivo	Positivo	Positivo	5
Positivo	Negativo	Positivo	1
Positivo	Negativo	Negativo	2
Positivo	Positivo	Negativo	3
Negativo	Positivo	Positivo	11
Negativo	Positivo	Negativo	1
Negativo	Negativo	Negativo	1
			24

Tabla 1: Resultados de la PCR en leche, presencia de lesiones compatibles con tuberculosis (LCT) y cultivo de tejidos, en las muestras de cabras reaccionantes a la tuberculina y con cultivo de leche negativo.

Discusión y conclusión:

En este trabajo se confirmó que la leche caprina constituye una buena matriz para la extracción de ADN de calidad para ser utilizado como templado de la PCR. La secuencia Rv2807 resultó adecuada para la detección de *M. bovis* en leche puesto que el 54,5% de las muestras positivas (6/11) tuvieron confirmación bacteriológica a partir de tejido. Un estudio previo realizado por Zumárraga y col. (2012) en bovinos lecheros permitió identificar rodeos infectados en tambos con certificación de libre de TBB, mediante el análisis de la leche del tanque. Considerando este antecedente, podemos concluir que el método utilizado para la detección de *M. bovis* en leche caprina es una estrategia valiosa y podría utilizarse complementariamente a las técnicas oficiales de diagnóstico. El VPP fue comparable al obtenido por Zumárraga y col. (2012) en leche de bovinos (51%). Si bien se requiere continuar trabajando para mejorar el método, y evaluarlo también en majadas caprinas libres de TBB para estimar su especificidad y VPN, podría considerarse su utilización en el marco de la vigilancia epidemiológica de la enfermedad. La PCR aportaría una nueva herramienta para la detección de *M. bovis* en esa matriz, alimento que por sus características nutricionales cobra cada vez más importancia en el país y en el mundo.

Bibliografía

-Araújo CP, y col. PLoS One. 2014 11; 9 (3):e91023.
-Herrera M. "Determinación de reaccionantes de PPD bovina y aviar en rodeos lecheros caprinos y ovinos. UNICEN, 1997.
-Magnano GG. "Evaluación de técnicas diagnósticas en tuberculosis caprina de áreas con alta y baja prevalencia de la región central de la República Argentina". UNRC, 2015.
-Underwood S, y col. Prevalencia de Brucelosis, Tuberculosis y Parartubeculosis en cabras para carne minifundistas en villa Ojo de Agua, Santiago del Estero. 25º Congreso Argentino de Producción Animal. 2002.
-Zumárraga MJ y col. Foodborne Pathogens and Disease. 2012; 9 (2):132-7.

B6- MICOBACTINA DE PRODUCCIÓN NACIONAL PARA UTILIZAR EN EL CULTIVO DE *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*: PRUEBA BIOLÓGICA PRELIMINAR

MA Romero[1,2], RD Moyano[3]; M Santangelo[3]; GE Travería[2].
1. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA). 2. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE), Chascomús. 3. Laboratorio de Biotecnología, INTA. Autor responsable: Romero Magali A, magaliandrea.romero@yahoo.com.ar

Introducción

La paratuberculosis bovina es una enfermedad bacteriana crónica producida por *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map), un bacilo acido alcohol resistente (BAAR). Esta enfermedad produce pérdidas productivas y económicas importantes por lo que es imprescindible su control. No existe hasta el momento tratamiento efectivo o vacuna aprobada por SENASA para la paratuberculosis, quedando el control restringido al diagnóstico y manejo de los animales. La prueba diagnóstica de oro es el cultivo bacteriológico, pero tiene su complejidad debido a lo exigente que es Map en cuanto a requerimientos para su crecimiento in vitro. En este sentido Map requiere en el medio de cultivo la presencia de un sideróforo, la micobactina, que hasta el momento en nuestro País se importa. En este trabajo se muestran resultados preliminares de una prueba biológica realizada con micobactina producida en el País (M. Nac) y comparada con la micobactina J® (M. J) en un medio de cultivo líquido producido también localmente. El objetivo de este trabajo es comprobar si la micobactina Nacional estimula el crecimiento de Map en la misma manera en que lo hace la micobactina J®, apoyándonos, en esta fase del trabajo, en la PCR *IS900* para demostrar la especificidad con cada una mediante un "status". Con este objetivo se pretende disminuir costos y facilitar la utilización del medio de cultivo como prueba de oro para el diagnóstico y en trabajos de investigación en estudios epidemiológicos y control efectivo de otras pruebas diagnósticas existentes y experimentales.

Materiales y métodos

Se utilizó el medio de cultivo líquido de Whittington *et al* (2013) con las modificaciones de Romero *et al* (2018) utilizando M. J ® y M. Nac extraída mediante la técnica de Snow (1970) a partir de *Mycobacterium avium* subsp *avium* cepa D4ER. Se utilizaron 35 muestras de materia fecal de bovinos mayores de 15 meses de raza Holando Argentina y Aberdeen Angus con ELISA positivo previo de la enfermedad. Las muestras fueron decontaminadas por el método de doble incubación - centrifugación y sembradas en ambos medios de forma pareada. Se incubaron en estufa a 37°C y observaron semanalmente con coloración de Ziehl Neelsen. Se consideraron positivas aquellas muestras donde se encontraron BAAR agrupados y con morfología compatible con Map en al menos uno de un mínimo de 50 campos revisados. Se confirmaron los positivos mediante PCR *IS900* siguiendo el protocolo de Collins *et al* (1993) a partir del cultivo. Los resultados se analizaron mediante chi cuadrado por separado M. J y M. Nac, considerando un "status" donde los verdaderos positivos son aquellos que se hayan confirmado por PCR *IS900* en alguno de los dos medios.

Resultados

De las 35 muestras sólo 8 resultaron positivas, de las cuales 6 lo fueron en ambos medios y 2 fueron positivas una en cada medio. No todas las muestras se pudieron confirmar por PCR. Los cultivos positivos y su PCR se resumen en la tabla, incluido el "status" que se usó para calcular el chi cuadrado y el tiempo de incubación hasta la lectura positiva en cada caso:

Muestra	M1			M2			Status
	R	T	RC	R	T	RC	
1	+	22	+	+	22	+	+
2	+	44	-	+	20	+	+
3	+	20	+	+	20	+	+
4	+	11	-	+	11	-	-
5	-			+	11	-	-
6	+	20	+	+	20	-	+
7	+	20	+	-			+
8	+	20	-	+	20	+	+

Referencias: M1: Medio líquido con M. J®. M2: Medio líquido con M. Nac. R: Resultado del cultivo. RC: Resultado de la PCR *IS900*. T: Tiempo de incubación hasta la lectura positiva (días).

Las pruebas de chi cuadrado dieron una p= 0,6538 en ambos casos, lo que demuestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre éstas y el status.

Discusión y conclusión

La paratuberculosis en la Provincia de Buenos Aires es un problema grave ya que existe una seroprevalencia cercana al 19% con pérdidas productivas que en el año 2007 alcanzaron los USD 22 millones en rodeos de cría y USD 6.3 millones en rodeos lecheros. Creemos que es imprescindible para el control de la enfermedad, así como también para las investigaciones, contar con micobactina disponible en la cantidad requerida y a un costo accesible para los laboratorios. Este trabajo demuestra que la micobactina Nacional y comercial funcionan de forma muy semejante, logrando resultados altamente coincidentes demostrado por un valor de p igual en ambas. Basándonos en esto concluimos que vamos camino a una alternativa al uso de la micobactina comercial facilitando el uso del cultivo en los estudios sobre paratuberculosis.

Bibliografía

-Collins DM and Col. 1993. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting Mycobacterium paratuberculosis in bovine faeces. Veterinary microbiology. 36 (3 – 4): 288-99.
-Romero M and Col. 2018. Medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Aplicación y análisis comparativo con el medio de Herrold: resultados preliminares. Analecta veterinaria. 38 (1): 50-55. Versión electrónica.
-Snow GA. 1970. Mycobactins: Iron-Chelating Growth Factors from Mycobacteria. Bacteriological Reviews. 34 (2): 99-125
-Whittington RJ and Col. 2013. Development and Validation of a Liquid Medium (M7H9C) for Routine Culture of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis to Replace Modified Bactec 12B Medium. Journal of Clinical Microbiology. 51(12): 3993–4000.

B7- NUEVOS HALLAZGOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ADENITIS EQUINA Y LA DETECCIÓN DE PORTADORES

C. Bustos[1], A. Muñoz[1], A. Etchecopaz[1], M. Martínez Vivot[1], M. Mesplet[1]
[1]Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Enfermedades Infecciosas

Introducción

La Adenitis equina es una enfermedad infecciosa producida por *Streptococcus equi* subsp. *equi* (*S. equi*) que afecta al tracto respiratorio superior de equinos principalmente jóvenes. Los signos clínicos incluyen hipertermia, decaimiento, rinitis con descarga nasal serosa a mucopurulenta, faringitis y linfoadenitis de cabeza y cuello que pueden ocasionar disnea y dificultad para deglutir. En algunos casos, la bacteria se disemina por vía linfo-hemática y produce una "adenitis bastarda" con la consiguiente formación de abscesos en diferentes linfonódulos y órganos.
Aproximadamente un 10% de los animales recuperados de la enfermedad pueden permanecer como portadores asintomáticos portando la bacteria en bolsas guturales y nasofaringe. Estos portadores actúan como fuente de infección para otros equinos susceptibles, mantienen la enfermedad en un establecimiento y pueden ingresar la enfermedad a establecimientos libres. En consecuencia, la detección de los portadores de *S. equi* es un punto clave para el control de la enfermedad.
S. equi es un coco grampositivo, β hemolítico, del grupo C de Lancefield que posee numerosos factores de virulencia entre los que se destacan la cápsula, la proteína M (SeM) y superantígenos SeeH, SeeI, SeeL y SeeM. Posee un 98% de homología genética con *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) que es un comensal de las mucosas y patógeno oportunista.
La adenitis equina se diagnostica con base en los signos clínicos característicos y su presentación frecuentemente en forma de brote y, se confirma con el cultivo bacteriológico o PCR directa a partir de linfonódulos abscedados, nasofaringe o descargas nasales. Los portadores se identifican mediante cultivo o PCR directa de muestras de bolsas guturales y/o nasofaringe. Es importante tener en cuenta que el diagnóstico puede dificultarse ante la presencia de otros comensales de la mucosa como *S. zooepidemicus.* Habitualmente pueden identificarse mediante su capacidad diferencial de fermentar lactosa, trehalosa y sorbitol y/o amplificación de genes característicos de *S. equi* como el *se*M, *see*H y *see*I mediante PCR. Sin embargo, recientemente se han detectado cepas atípicas de *S. equi* que comparten características tanto de *S. equi* como de *S. zooepidemicus,* dificultando la identificación final del microorganismo.
El objetivo de este trabajo fue reportar los hallazgos de cepas atípicas de *S. equi* locales y describir la ruta microbiológica para un correcto diagnóstico de adenitis equina y detección de portadores.

Materiales y métodos

Se trabajó con un total de 23 aislamientos del cepario de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas que habían sido previamente identificados como *S. zooepidemicus* por su perfil de fermentación (lactosa y sorbitol positivos y trehalosa negativos) y la ausencia del gen *see*H, que son las pruebas de rutina para el diagnóstico de este agente. Diecinueve cepas habían sido aisladas de nasofaringe de equinos clínicamente sanos y 4 a partir de muestras de equinos con signología de adenitis equina.
Se realizó la amplificación de los genes *se*M y *see*I característicos de *S. equi* mediante la reacción de PCR. Los productos de la amplificación del gen *se*M de 8 cepas fueron purificados y secuenciados por electroforesis capilar en secuenciadores automáticos en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología CICVyA del INTA Castelar. Luego de la edición y el análisis de las secuencias nucleotídicas, se compararon con aquellas publicadas en *GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI)* y se determinaron los alelos *se*M según la base de datos internacional de MLST (http://pubmlst.org/szooepidemicus/).

Resultados

Del total de aislamientos estudiados, 22 fueron negativos al gen *see*I y 12 positivos al gen *se*M. Los aislamientos previamente identificados como *S. zooepidemicus* fueron clasificados como *S. equi* atípico cuando amplificaron al menos el gen *se*M (tablas 1 y 2).

	S. equi	*S. zooepidemicus*	*S. equi* atípico
Lactosa	-	+	+
Trehalosa	-	-	-
Sorbitol	-	+	+
Gen *seM*	+	-	+
Gen *see*H	+	-	+/-
Gen *see*I	+	-	+/-

Tabla 1: Criterios de clasificación de las cepas de *S. equi, S. zooepidemicus* y *S. equi atípico*.

Animales	*S. equi* atípico	*S. zooepidemicus*	
Clínicamente sanos	8	11	19
Enfermos	2	2	4
	10	13	23

Tabla 2: Resultados de la detección de cepas atípicas de *S. equi.*

Las secuencias de los productos de PCR del gen *se*M analizadas correspondieron a alelos previamente identificados únicamente en Argentina en cepas típicas de *S. equi* (SeM 129, 132 y 133).

Discusión

La Adenitis equina es una enfermedad con una elevada prevalencia en nuestro país que genera importantes pérdidas económicas. Sin dudas, su diagnóstico de certeza y la detección de portadores son indispensables para su control integral.
En el presente estudio se identificaron 8 cepas atípicas a partir de 7 animales clínicamente sanos que serían portadores asintomáticos de la enfermedad y, un *S. equi* atípico a partir de un potrillo que presentó un cuadro respiratorio con linfoadenopatía submandibular leve de forma aislada.
Estas cepas atípicas de *S. equi* que han perdido genes de virulencia y han adquirido la capacidad de fermentar otras fuentes de hidratos de carbono podrían considerarse atenuadas y con una mayor capacidad de adaptación que las cepas típicas. Sin embargo, es interesante destacar que una de las cepas atípicas se aisló de un equino con un cuadro de adenitis bastarda con signología respiratoria alta y abscesos en diferentes regiones corporales.
El hallazgo de estas cepas de *S. equi* circulando en nuestro medio local, debe ser tenido en cuenta al momento de diagnosticar la adenitis equina y detectar portadores asintomáticos y así evitar los resultados falsos negativos.
Por último, se propone continuar con el estudio de la virulencia de estas cepas en el equino, así como su capacidad de colonizar e infectar otras especies animales.

Bibliografía

-Harris SR, Robinson C, Steward KF, Webb K S, Paillot R, Parkhill J, Holden MT, Waller AS. (2015). Genome specialization and decay of the strangles pathogen, *Streptococcus equi*, is driven by persistent infection. *Genome Research*, *25*(9), 1360–1371.
-Libardoni F, Vielmo A, Farias L, Matter L, Pötter L, Spilki F, Vargas A (2013). Diversity of seM in *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from strangles outbreaks. Veterinary Microbiology, 162(2): 663-669.
-Martins de Moraes C, Silva S, Castagna de Vargas A, Nogueira CE, Leite FP, Gil-Turnes C. (2009). Immunogenicity and cross reactivity indices of *Streptococcus equi* subsp. *equi* strains isolated from cases of Strangles and commercial vaccines. *Ciência Rural*, *39*(5), 1459-1464.
-Waller A, Paillot R, Timoney J (2011). *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. Journal of medical microbiology, 60(9):1231-1240.

B8- DETECCIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *Staphylococcus* spp. AISLADOS DE ANIMALES DE PRODUCCIÓN y DE COMPAÑÌA EN EL SUR DE SANTA FE

N. Pereyra [1*], S. Francois [1], V. Cane [1], J. Freije [1], J. Cane [2], E. Comba[1], G. Tártara [1]
[1] Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario; [2] Becaria, Becas de Promoción Científica Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario; * npereyra@medax.com.ar

Introducción

Las bacterias del Género *Staphylococcus* producen enfermedades en grandes y en pequeños animales. En los porcinos, la epidermitis exudativa que afecta lechones y cerdos destetados es causada por *Staphylococcus hyicus*, aunque otras especies como *Staphylococcus aureus* intervienen en la producción de la entidad[2]. La especie *S. pseudointermedius* del grupo *Staphylococcus intermedius*, se encuentra como comensal de piel y mucosas en el 80% de los perros sanos y se aisla frecuentemente desde muestras clínicas provenientes de piel, oídos, huesos y abscesos postquirúrgicos[4].

En la actualidad se ha detectado un aumento en el aislamiento de estafilococos resistentes a los antimicrobianos de uso corriente, en cerdos, en perros, y en forma preocupante en humanos[1,2,3,4]. Se conocen diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana en los estafilococos. La producción de betalactamasas que hidrolizan el anillo betalactámico determina la resistencia a penicilinas (excepto las semisintéticas) generando compuestos inactivos, mientras que la producción de la proteína fijadora de penicilina PBP2a (expresión del gen *mec*A) determina la resistencia a meticilina (o penicilinas semisintéticas); ésto último implica resistencia a todos los grupos de betalactámicos, pudiendo solo excluirse ciertas cefalosporinas de última generación[1].

También se ha detectado resistencia al grupo MLSB (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B) provocada por diferentes mecanismos como acción de metilasas (genes *erm*), expulsión (genes *msr*A), inactivación (genes *lnu*) y modificación de la diana (mutación del ARNr 23S y/o de proteínas ribosómicas). Los MLSB tienen estructuras diferentes pero formas de acción similares y la resistencia (R) a la eritromicina (Er) se relaciona con aquella a la lincomicina o clindamicina (Cl). El fenotipo I consiste en R constitutiva a Er y Cl, el fenotipo II en R a Er y sensibilidad (S) a Cl, y el III implica R a Er con S inducida a Cl que se visualiza por un halo achatado o D-test positivo[1].

El objetivo de este trabajo fue detectar resistencia a las penicilinas y al grupo MLSD en cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de cerdos con epidermitis exudativa y de perros con piodermatitis y otitis, y comparar los resultados con los tratamientos habituales en esas especies animales.

Materiales y métodos

Cerdos. Se aislaron (siembra en agar sangre e incubación a 37°C, 24 hs) 31 cepas de *Staphylococcus* spp. desde piel y órganos de cerdos muertos por epidermitis exudativa; se identificaron 16 como S *hyicus*, 8 como *S aureus* y 7 como estafilococos coagulasa negativos (ECN) según características de las colonias (color y hemólisis) y pruebas bioquímicas estandarizadas (coagulasa, oxidación/fermentación del manitol, utilización de trehalosa y maltosa, producción de ureasa y de acetoína).

Perros. Se muestrearon perros con lesiones dérmicas y otitis y se rescataron 10 cepas de *Staphylococcus pseudointermedius;* el aislamiento y la identificación se realizó de la misma forma que en las cepas de porcinos.

Detección fenotípica de resistencia. Se realizaron antibiogramas con el método de difusión en agar y se midieron los halos de inhibición siguiendo los criterios de CLSI 2011[3]. Se utilizaron discos de penicilina 10UI para la detección de betalactamasas (R ≤ 28 mm), y de oxacilina 1µg (R ≤ a 10 mm) y cefoxitina 30µg (R ≤ a 24mm; R en *S. aureus* ≤ a 21 mm) para la detección de resistencia a la meticilina. También se probaron discos de eritromicina 15µg (R ≤ a 13mm) y clindamicina 2µg (R ≤ a 14 mm) para la detección de resistencia al grupo MLSB.

Resultados

Cerdos. *S hyicus*: el 68% de las cepas fue resistente a la penicilina, el 87,5% a la oxacilina y cefoxitina, el 50% a la eritromicina y el 81% a la clindamicina; *S aureus*: el 100% de las cepas fue resistente a la penicilina, oxacilina y cefoxitina, el 50% a la eritromicina y el 75% a la clindamicina; ECN: el 100% de las cepas fue resistente a la penicilina, el 85,7% a la oxacilina y cefoxitina, el 28% a la eritromicina y el 57% a la clindamicina. Con respecto a los fenotipos de resistencia a Er y Cl, se determinó que 13 cepas poseían el fenotipo I y 1 el fenotipo II (ninguna el III); el resto eran sensibles a Er y resistentes a Cl.

Perros. *S pseudointermedius*: el 73% de las cepas fue resistente a la penicilina pero no se detectó resistencia a oxacilina y cefoxitina; el 36% de las cepas fue resistente a la eritromicina y el 18% a la clindamicina; entre las cepas resistentes, 2 presentaron el fenotipo I y 2 el fenotipo II (ninguna reveló el fenotipo III).

Discusión y conclusiones

Se investigó a través de métodos fenotípicos la resistencia a algunos antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de animales en el sur de la Provincia de Santa Fe, de manera de obtener datos actualizados en esta temática.

En los cerdos se encontró un elevado porcentaje de cepas de *Staphylococcus* resistentes a las penicilinas, en especial a la meticilina; también es importante la resistencia de *S. hyicus* y *S. aureus* a la clindamicina pero menos importante a la eritromicina. Estos resultados se relacionan con el uso de antimicrobianos en Argentina para el tratamiento de la epidermitis exudativa: se administra amoxicilina y ceftiofur pero no eritromicina (no hay comerciales para cerdos) ni lincomicina, aunque esta última se aplica en otras patologías porcinas; macrólidos como tilosina, tiamulina y tilmicosina son utilizados para patologías respiratorias y digestivas.

Los resultados en los perros son preliminares ya que el número de cepas estudiado es bajo. Se comprobó que la presencia de betalactamasas es elevada, pero no se detectaron cepas resistentes a la meticilina. La resistencia a la eritromicina y clindamicina es baja, pero estos antibióticos no son muy utilizados en la clínica para las patologías caninas producidas por estafilococos. Mientras que las muestras de cerdos fueron recolectadas en criaderos comerciales donde se utilizan antimicrobianos tanto en forma preventiva como terapéutica, las de perros provinieron de animales de refugios, lo que hace suponer que difícilmente hayan recibido tratamientos antibióticos. A diferencia de los provenientes de perros, en la mayoría de los estafilococos de cerdos se detectaron mecanismos de resistencia. Se ampliará el estudio a más cepas y se comparará con los resultados en humanos.

Como conclusiones puede decirse que al investigar mecanismos de resistencia por métodos fenotípicos en cepas de estafilococos aislados de cerdos y de perros en el sur de Santa Fe, se encontró un elevado porcentaje de cepas resistentes especialmente en los cerdos; la aparición de resistencia es indicativa de la forma en que se utilizan los antibimicrobianos en la práctica médica por lo que es función del Médico Veterinario evitar la generación de bacterias resistentes en animales de producción y de compañía por la posibilidad de que esas resistencias se transmitan a bacterias del hombre.

Bibliografía.1-Ardanuy C. y col. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de Resistencia en grampositivos. En: Cercenado E y Cantón R (coord.) Procedimientos en Microbiología Clínica, Madrid; SEIMC.

2-Cameron R. (2006). Diseases of the Skin. En: Diseases of Swine, 9º edición, Blackwell Publishing, USA, pág 179-99.

3-Clinical and Laboratory Standards Institute (2011). Perfomance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21ST informational supplement; document M100-S21; vol. 31 Nº1, Wayne, PA.

4-Maali Y. y col. (2018). Understanding the virulence of *Staphylococcus pseudointermedius*: a major role of pore-forming toxins. Frontiers in Celullar and Infection, vol. 8, art. 221.

B9- CUANTIFICACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM EN CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AISLADOS DE MASTITIS BOVINA

E. Bottini[1,2]; F. De Marco[4]; S. Ibarguren Quesada[4] ; C. Cacciato,C[1,3].; L. Doumecq.[1]; P. Soto.[1] C. Monteavaro[1]
[1]Area de Microbiología, SAMP, CIVETAN. CICPBA FCV-UNCPBA. [2]Becaria de CONICET- CIVETAN. [3]Personal de Apoyo CICPBA. [4]Estudiante FCV-UNCPBA.
cmonteav@vet.unicen.edu.ar

Introducción

Staphylococcus aureus (S. aureus) es el agente etiológico de mastitis más prevalente en rumiantes generando grandes pérdidas en la industria lechera. *S. aureus* presenta distintos factores de virulencia vinculados a la adherencia inespecífica al epitelio de la glándula mamaria. La producción de un slime cumple un rol importante para la adhesión, colonización y producción final del biofilm. Este es una matriz de exopolisacáridos compleja, en la cual *S. aureus* queda inmerso protegido del sistema inmune. Por otra parte, se ha comprobado que las bacterias en este estado son mil veces más resistentes a los efectos de los agentes antimicrobianos comparado con las bacterias planctónicas (Ciftci, 2009). Actualmente se utilizan distintos métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de cepas que producen *biofilm*, tales como la prueba en microplaca, cultivo Agar Rojo Congo, búsqueda de genes *ica, bap,* etc. (Goyal, et al 2014). En nuestro grupo de trabajo hemos desarrollado un protocolo para la detección de la formación de biofilm por microplaca el cual surgió como resultado del trabajo final de la Tecnicatura en Alimentos de la FCV-UNCPBA, (Ibarguren Quesada, S. 2017). Peña y Uffo (2013) analizando la producción de biofilm en cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina reportaron que no todas las cepas producen con la misma intensidad. El 98% son positivas a la producción de biofilm y 2% son negativas. De las positivas, el 40,8% presenta una fuerte intensidad, 33,7% moderada y 23,5% débil (Peña y Uffo, 2013). El objetivo del presente trabajo es cuantificar la formación de *biofilm* en 64 cepas de *S. aureus* obtenidas a partir de leche bovina, a través del método de microplaca y el cultivo Agar Rojo Congo modificado (ARGm) y establecer la correlación entre ambos métodos.

Materiales y métodos

Se utilizaron 64 cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis clínica de 10 establecimientos de la Cuenca Mar y Sierras, Bs. As. Se procesaron según el protocolo de Ibarguren Quesada (2017). Las cepas se cultivaron por 24 horas a 37°C en Caldo Tripteina Soya con Glucosa al 1% (CTSg). A partir de los CTSg se realizaron cultivos en placas de ARGm mediante la siembra con la técnica de estriado. Se incubaron a 37ºC durante 24 horas y se dejaron 24 horas más a temperatura ambiente. Se consideraron positivas el crecimiento de colonias negras y rugosas y negativas las colonias rojas y lisas. Se realizó un método cuantitativo en microplaca de 96 pocillos con fondo plano. A partir de los CTSg, se realizó una dilución 1:100 en CTSg de cada cepa. Luego, se colocaron 200 µl por pocillo de la dilución, por triplicado de cada cepa, incubándose por 24 horas a 37ºC en aerobiosis. Transcurrido el tiempo, el contenido de los pocillos se descartó en un recipiente con hipoclorito de sodio al 10%. Posteriormente se realizaron 3 lavados con solución buffer fosfato pH 7,2. Se fijaron con metanol por 15 min y se tiñó con cristal violeta al 1 % 15 min. Se eliminó el colorante con 4 lavados con agua destilada. A continuación, se dejó secar a temperatura ambiente y se realizó una elución del colorante con alcohol:acetona (80:20) por 15 min. Se realizó la lectura de la densidad óptica en un lector de Elisa a 570 nm. Para cuantificar la producción de *biofilm* se aplicó la fórmula publicada por Stepanovic (2007). El valor de corte por DO (DOc) se definió como el valor de la media del blanco más tres desviaciones estándar por encima de la misma, por lo tanto las cepas se clasificaron como no productoras de Biofilm (DO ≤DOc); débiles productoras de Biofilm (DOc< DO ≤ 2 x DOc); productoras moderadas de Biofilm (2 x DOc< DO ≤ 4 x DOc) y fuertes productoras de Biofilm (4 x DOc< DO). Una vez obtenidas las densidades ópticas, se obtuvieron los promedios de las mismas para cada aislamiento y se compararon con el valor de corte del blanco. Como control positivo, se utilizó una cepa de referencia productora de *biofilm* y como control negativo una cepa no productora y CTSg sin inocular.

Resultados

Respecto al cultivo en ARGm, el 100% (64/64) de las cepas resultaron positivos a la formación de bioflm. Mediante el método de la microplaca, de los 64 aislamientos estudiados, el 75% produjo biofilm (16,6% fuertes, 31,25% moderados y 56,25% débiles productoras de biofilm) y el 25 % no producen.

Discusión y conclusiones

De los resultados obtenidos se puede observar que la correlación entre el método de cultivo en ARGm y la prueba en microplaca es baja.

El primer método es decir la utilización del ARGm presenta poca sensibilidad con alta presencia de falsos positivos, los cuales dan resultados negativos en la microplaca. Con respecto a la distribución en fuerte, moderado, débil y no productoras no coinciden con el trabajo de Peña y Uffo, excepto los porcentajes de moderada producción. Esta evaluación fenotípica debería contrastarse con la búsqueda de genes relacionados con la producción de biofilm como *ica* y *bap* para evaluar la correlación entre la presencia de estos genes con los resultados obtenidos por el método de microplaca. La producción de biofilm es un procedimiento complejo de reproducir bajo condiciones *in vitro.* Además *in vivo* se dan diversos fenómenos difíciles de reproducir que determinan la presencia o no de biofilm e incluso su intensidad. Los métodos fenotípicos para determinar la producción de biofilm distan en gran medida de lo que sucede in vivo en los distintos nichos de colonización, más aun cuando se refiere a glándula mamaria, debido a la complejidad de la matriz leche y de alvéolos mamarios.

Bibliografia

- Ciftci A. et al (2009). Detection of Methicilin Resistance and Slime Factor production of Staphylococcus aureus in bovine mastitis. Braz J Microbiol, 40 (2):254-261.
- Goyal et al (2014). Genotypic and Phenotypic Characterization of Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* for Biofilm Formation Ability. Adv Anim Vet Sci, 2 (4):233-238.
- Ibarguren Quesada, S. (2017). Detección de Biofilm de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche bovina de vacas con mastitis clínica. Trabajo final para la obtención de título de Tecnicatura en Alimentos. FCV-UNCPBA.
- Peña, J.; Uffo O. (2013). Producción de biofilm en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. Rev Salud Anim, 35(3):189-196
- Stepanovic´ S. et al (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS, 115 (8):891-899.

B10- EVALUACIÓN DE UNA PCR DE PUNTO FINAL Y DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS OVINA

M.S. Homse[1], L.P.Alvarez[2], C.A. Robles[3]*
[1]Universidad Nacional del Comahue/INTA, Bariloche, Río Negro, Argentina.
[2] IPATEC, CONICET, Bariloche, Río Negro, Argentina.
[3] INTA, Grupo de Salud Animal, EEA Bariloche, Rio Negro, Argentina. *robles.carlos@inta.gob.ar

Introducción

La brucelosis ovina es una enfermedad crónica causada por *Brucella ovis* que genera epididimitis e infertilidad en carneros y abortos en ovejas, produciendo un impacto negativo sobre la producción de la majada. El cultivo bacteriológico es el método considerado estándar de oro, sin embargo presenta ciertas limitaciones para su uso en el diagnóstico de rutina como el tiempo que demanda hasta obtener un resultado final y la posible contaminación de las muestras, entre otros. En los últimos años, se ha intentado mejorar el diagnóstico de la enfermedad mediante el desarrollo de técnicas basadas en biología molecular, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El objetivo de este estudio fue evaluar una PCR de punto final para *B. ovis* sobre muestras de semen de carneros, utilizando dos métodos de extracción de ADN, y compararla con el cultivo bacteriológico.

Materiales y métodos

Se trabajó con 43 muestras de semen provenientes de carneros con aislamiento positivo para *B. ovis* y 17 muestras de un establecimiento libre de brucelosis ovina. Se diseñó una PCR de punto final que se evaluó sobre ADN extraído con dos métodos: a partir de 25 µl de semen con el método de Chelex (PCR-CH) y a partir de 500 µl de semen con el método Fenol-Cloroformo (PCR-FC). La amplificación por PCR de punto final se llevó a cabo utilizando los cebadores correspondientes al gen BOV_A0500, exclusivo de *B. ovis* y *B. pinnipedialis* Fw: 5'-TGGTATCTTCAGCCGTTCCAAG-3' y BOV_A0500 Rv: 5'-ATCTTTGCCCGTTCAGTCG-3' (Tsolis y col., 2009). La mezcla de reacción de PCR estuvo compuesta por 200 µM de cada dNTP, 0.5 µM de cada cebador, 1.5 mM de Mg^{2+}, 1.25 U de Taq ADN polimerasa y 1 µl de ADN en un volumen final de 25 µl. Los parámetros de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C, con un paso final de extensión de 5 min a 72°C. Como control positivo se utilizó 1 µl de ADN obtenido de colonias de *B. ovis*. Como controles negativos se utilizaron ADN de colonias de *B. abortus, B. melitensis, Actinobacillus seminis, Histophilus somni* y agua. Se determinaron los límites de detección de las PCRs mediante diluciones seriadas de ADN de *B. ovis*, y la sensibilidad y especificidad diagnósticas de las PCRs respecto al cultivo bacteriológico mediante el análisis del diagrama interactivo en el programa MedCalc versión 17.2.

Resultados

Ambas PCRs presentaron un límite de detección de 0.01 ng/µl de ADN y fueron específicas, ya que resultaron negativas sobre los ADN de *B. abortus, B. melitensis, H. somni* y *A. seminis.* Por otro lado, la clasificación de las muestras como positivas o negativas a *B. ovis* se realizó en base a la presencia o ausencia, respectivamente, de la banda de 225 pb correspondiente al control de *B. ovis* (Fig.1). La PCR-FC presentó una sensibilidad diagnóstica mayor que la PCR-CH respecto al cultivo bacteriológico, pero esta última presentó mayor especificidad diagnóstica (Tabla 1).

Tabla 1: Sensibilidad y especificidad diagnósticas de las PCR según los dos métodos de extracción de ADN ensayados.

Tipo de PCR	Sensibilidad diagnóstica (%)	Especificidad diagnóstica (%)
PCR-CH	86.05	100
PCR-FC	95.35	81.25

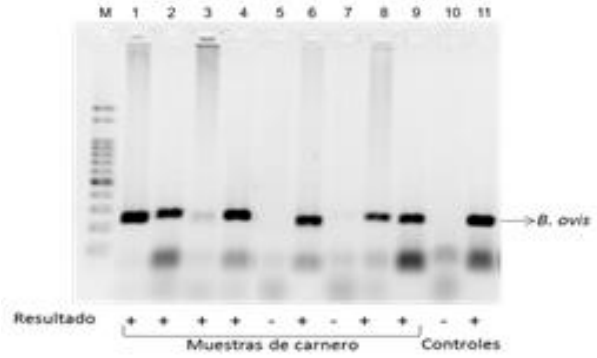


Figura 1. Productos de PCR obtenidos sobre ADN de muestras de semen. Calle M: Marcador de peso molecular de 100 pb. Calles 1 a 9: muestras de semen de carneros con sospecha de brucelosis ovina. Calle 10: control negativo de agua. Calle 11: control positivo.

Discusión y conclusión

El diseño de PCR fue óptimo para la amplificación del fragmento de ADN de *B. ovis* elegido como cebador, logrando ser específico y con un buen nivel de detección de ADN de *B. ovis*.

Las diferencias observadas en los porcentajes de sensibilidad y especificidad diagnósticas para cada PCR, podrían estar relacionadas al método de extracción de ADN utilizado. En la PCR-FC, la menor especificidad diagnóstica con respecto a la PCR-CH podría deberse a contaminaciones durante las extracciones de ADN de las muestras, debido a los múltiples pasos de transferencia y descarte que implica el proceso de extracción con Fenol-Cloroformo. Por otro lado, la menor sensibilidad diagnóstica obtenida en la PCR-CH podría deberse a problemas de inhibición de la PCR, ya que se obtiene un ADN de menor calidad con este método respecto al de Fenol-Cloroformo. Según Manuja y col. (2010), el semen posee células espermáticas y no espermáticas que pueden inhibir la PCR, y bioquímicamente está compuesto por una gran cantidad de ADN y proteínas, por lo que el método de extracción elegido es importante para obtener ADN de buena calidad y así contribuir al éxito de la PCR.

Ambas PCRs podrían utilizarse como técnicas diagnósticas complementarias al cultivo bacteriológico para abordar el diagnóstico de la brucelosis ovina. Sin embargo, si se tiene en cuenta el tiempo y costos requeridos para cada método de extracción de ADN, se sugiere optar por el método de Chelex, que si bien se debe seguir desarrollando para mejorar su sensibilidad, permite una extracción más rápida y más económica.

Bibliografía

-Manuja A.; Manchanda S.; Kumar B.; Khanna S. y Sethi R. K. (2010). Evaluation of different methods of DNA extractions from semen of buffalo (*Bubalis bubalis*) bulls. Buffalo Bulletin, 29(2):109-128.

-Tsolis R. M., Seshadri R., Santos R. L., Sangari F. J., García Lobo J. M., de Jong M. F., Ren Q., Myers G., Brinkac L. M., Nelson W. C., DeBoy R. T., Angiuoli S., Khouri H., Dimitrov G., Robinson J. R., Mulligan S., Walker R. L., Elzer P. E., Hassan K. A. & Paulsen I. T., 2009. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. PLoS ONE, 4:1-9.

B11- MLVA-16 PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DE *BRUCELLA MELITENSIS* A PARTIR DE TEJIDOS CAPRINOS Y OVINOS PROVENIENTES DE LA PROVINCIA DE SAN LUIS

M. Arregui[1]; L. Samartino[1]
[1]Instituto de Patobiología. Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas. INTA Castelar
email: arregui.matias@inta.gob.ar

Introducción

La brucelosis es una enfermedad zoonótica endémica de Argentina. En animales, *Brucella melitensis* encuentra como hospedadores de preferencia a caprinos y ovinos. Al momento del diagnóstico bacteriológico, la baja sensibilidad de la técnica, lleva a que muchas veces no se pueda avanzar con herramientas complementarias destinadas a estudiar o evaluar brotes de brucelosis, ya que no se dispone de los aislamientos en pureza. En el caso de contar con el ADN de *B. melitensis*, una posibilidad es ejecutar una genotipificación mediante MLVA-16 (Multi Locus VNTR Analysis-16), consistente en analizar 16 secuencias repetidas en tándem y de esa manera poder asignar trazabilidad e identidad a la presencia de *B. melitensis.* El objetivo de este trabajo fue la genotipificación mediante MLVA-16 aplicando la técnica directamente sobre ADN tisular de caprinos y ovinos infectados y comparar los resultados con los genotipos obtenidos de aislamientos.

Materiales y métodos

Se realizó el diagnóstico serológico de brucelosis sobre un grupo de animales de diferentes establecimientos provenientes de la localidad de la Botija, departamento Ayacucho, provincia de San Luis. Las técnicas utilizadas fueron: prueba de aglutinación con antígeno buferado (BPA), ensayo de polarización fluorescente (FPA) con un punto de corte de 85 mP y fijación de complemento, utilizando como punto de corte 20 UIFC. Se practicó la necropsia de 16 animales serológicamente positivos (12 caprinos adultos y 4 ovinos).

De las necropsias se recuperaron muestras de bazo, linfonódulos (inguinal superficial), hígado, tejido mamario y leche. Los mismos se conservaron mediante congelamiento y se procesaron en el laboratorio por bacteriología clásica para intentar obtener los aislamientos de *Brucella melitensis*. Los tejidos fueron sembrados para enriquecimiento en caldo Brucella (DIFCO ®) y repicados diariamente en medio selectivo adicionado con antibióticos (Brucella selective supplement 00083A, OXOID ®). La tipificación de los aislamientos se realizó utilizando test de catalasa, test de oxidasa, prueba de ureasa, producción de ácido sulfhídrico, el crecimiento diferencial en medios con la inclusión de colorantes (fucsina y tionina) y aglutinación con antisueros monoespecíficos A y M.

En simultáneo se realizó la extracción de ADN total de tejidos mediante kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN ®). Se trabajó con los tejidos en forma individual y mediante la extracción ADN de pool de cada animal. Mediante PCR, utilizando como templado la purificación previa de ADN, se buscó la presencia de la secuencia de inserción *IS711* que presenta polimorfismo específico de especie, utilizando el juego de primers y las condiciones descriptas por Bricker *et al*. Se tuvieron en cuenta para análisis posteriores solo aquellas muestras que presentaron una banda positiva para *B. melitensis* (730 bp) o se seleccionó solo una muestra positiva por animal. Posteriormente se ejecutó la secuencia de PCRs del panel MLVA-16 (Le Flèche *et al*.) sobre las muestras de ADN total seleccionadas, analizándose los locus: Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45, Bruce55, Bruce18, Bruce19, Bruce21, Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 y Bruce30. Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% y 3% (dependiendo de los locus analizados del panel de MLVA) y fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio. Se calculó el tamaño de los amplicones utilizando la herramienta informática *gel analysis* (UVIpro®). Se analizaron y compararon los patrones de bandas de MLVA obtenidos. Se utilizó como control positivo extracción a ADN de *Brucella melitensis* 16M, cuyos amplicones ya son conocidos.

Resultados

Los animales muestreados fueron positivos a todas las pruebas serológicas. Se obtuvieron 3 aislamientos de *Brucella melitensis* biovar 1 de tejidos provenientes de cabras (3/12). No se recuperaron aislamientos compatibles con *Brucella* spp. de los tejidos ovinos (0/4) Los aislamientos provinieron del procesamiento de linfonódulos principalmente (2/3) y de bazo (1/3), pertenecientes a 3 animales diferentes.

Se logró identificar la presencia de ADN de *Brucella melitensis* en 8/12 caprinos mediante la amplificación de la secuencia de inserción *IS711* y en 2/4 ovinos. Se consideró animal positivo a PCR cuando se observó la presencia de una banda compatible con *B. melitensis* en por lo menos una de las muestras analizadas. En este caso, las muestras de linfonódulos también fueron sobre las que se obtuvo un mejor desempeño.

MLVA-16 mostró 2 diferentes genotipos al momento de utilizar ADN proveniente de aislamientos (GEN01 y GEN02)

A partir de del procesamiento del ADN proveniente de tejidos, MLVA mostró 5 diferentes genotipos (GEN03, GEN04, GEN05, GEN06 Y GEN07) distintos a los provenientes de aislamientos.

Tabla 1: Genotipos obtenidos mediante MLVA-16

16M	3	4	2	13	4	2	3	3	5	36	6	2	5	8	3	6
GEN01	3	4	2	13	4	2	3	3	4	40	8	4	4	3	6	10
GEN02	3	4	3	13	5	2	3	3	6	36	5	2	5	8	6	8
GEN03	3	4	2	12	4	2	3	3	4	41	8	4	4	3	6	10
GEN04	3	4	2	13	4	2	3	3	4	40	5	4	4	3	6	8
GEN05	3	4	2	13	5	2	3	3	4	40	8	4	4	3	6	6
GEN06	3	4	2	13	4	2	3	3	4	36	8	4	4	3	6	8
GEN07	3	4	2	13	4	2	3	3	6	36	8	4	4	3	6	8

El genotipo proveniente del ADN de tejidos ovinos (GEN07) fue el mismo y coincidió con el observado en algunos caprinos.

El genotipo GEN02 fue el más observado (4/11) en las muestras de ADN provenientes tanto de aislamientos, como de tejidos. Los genotipos provenientes del ADN tisular coincidieron 100% con los de los aislamientos de *B. melitensis* obtenidos del mismo animal.

Discusión y conclusiones

MLVA-16 representa una herramienta epidemiológica importante para el conocimiento de genotipos circulantes de *Brucella* spp. y formular estrategias para el control de la enfermedad, analizar la aparición de brotes mediante trazabilidad o aparición de nuevas cepas. Los tejidos ovinos analizados, a pesar de no poder brindar aislamientos, permitieron obtener información importante, ya que comparten genotipo de *Brucella melitensis* con los caprinos del mismo establecimiento. Mediante estos procedimientos se pone en evidencia la capacidad de analizar directamente tejidos o productos derivados de animales de manera anticipada, mientras se procesan las muestras para obtener aislamientos.

Bibliografía

-De Massis F *et al.* 2015. Transbound Emerg Dis. 62(5):463–9.
-Le Flèche P *et al*.2006. BMC Microbiol. 6:1–14.
-OIE.2017. Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas para los Anim Terr. 47.

B12- MENINGITIS TUBERCULOSA EN UNA TERNERA: REPORTE DE CASO

C. Garro[1], W. Morris[1], C. Olguin Perglione[1,2], F. Delgado. [1,4], J. Schapiro[1,4], M. Zumarraga[3], S. Garbaccio[1].
1. Grupo de Investigación Diagnóstica Veterinaria. Instituto de Patobiología (CICVyA – INTA). 2. Instituto de Virología. CICVyA-INTA. 3. Instituto de Biotecnología. CICVyA – INTA. 4. Carrera de Veterinaria. Universidad del Salvador.
E-mail: garro.carlos@inta.gob.ar Tuberculous meningitis in a calf: case report

Introducción
La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad del ganado producida por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), agente patógeno zoonótico capaz de infectar también a otras especies animales (Phillips et al., 2003). El objetivo de este estudio es describir los signos clínicos y las características patológicas y epidemiológicas de un caso de meningitis tuberculosa en una ternera de un rodeo lechero.

Materiales y métodos. El caso fue investigado en abril de 2017 por el Grupo de Investigación Diagnóstica Veterinaria del Instituto de Patobiología (CICVyA-INTA-Hurlingham). Se trató de una ternera Holando argentino de 10 meses de edad, perteneciente a un rodeo lechero del partido de Lobos, provincia de Buenos Aires. En el mismo, se aplicaba la prueba de la tuberculina en el pliegue ano – caudal a todas las categorías mayores de 3 meses de edad (Resolución SENASA 128/2012). En el último diagnóstico general, realizado siete meses previo a este estudio, habían tenido terneras positivas a la prueba de la tuberculina en la crianza artificial. La ternera evaluada había resultado negativa. Debido a ese brote de TB, habían cambiado el tipo de alimentación de los terneros pasando de leche cruda a sustituto lácteo. La ternera evaluada, integraba un corral junto a un grupo de bovinos de entre 8 y 10 meses de edad (n = 80) que eran alimentados con una dieta a base de silo de maíz y fardo de alfalfa. En dicho grupo, habían ocurrido previamente dos casos de animales con signología nerviosa (incoordinación y apatía) y los mismos habían sido segregados y eliminados del corral. El animal investigado había presentado signos nerviosos de incoordinación e hiperexcitabilidad, durante al menos 30 días previo a este estudio. El veterinario privado, le había suministrado dexametasona y el cuadro clínico mejoraba temporalmente. Debido al prolongado curso de signología neurológica sin mejora tras los tratamientos, se realizó la eutanasia. Para ello, se utilizó un sedante-miorrelajante (Xilacina 20 mg/mL; Richmond Vet Pharma®) seguido por la aplicación de pentobarbital sódico (Euthanyle-Brouwer®) a dosis-efecto. Se colectaron muestras, presentarán o no lesiones, de pulmón, riñón, bazo, hígado, linfonodos (retrofaríngeos mediales, mediastínicos, traqueobronquiales, hepáticos y mesentéricos), encéfalo y meninges, para análisis histológico y bacteriológico. Para el análisis histológico, las muestras fueron fijadas en formaldehído al 10% y procesadas por la técnica de inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 4 micrones de espesor y fueron teñidos con hematoxilina eosina y Ziehl-Neelsen (ZN).

Resultados. Durante la inspección clínica, el animal presentaba signos de incoordinación motora, hipermetría, lordosis, ceguera y desorientación. La magnitud de los signos se incrementaba al exigirle la marcha. En la necropsia se observaron, en pulmón y linfonodos traqueobronquiales y mediastínicos, lesiones compatibles con TB (LCTB). No se observaron alteraciones en hígado, riñones y linfonodos retrofaríngeos mediales, mesentéricos y hepáticos. En cavidad craneana, se observó hiperemia y múltiples granulomas en las meninges distribuidos principalmente en la base de ambos hemisferios cerebrales y cerebelo, con un tamaño variable de entre 2 a 5 mm de diámetro, circulares y de color blanco. El examen histológico reveló una meningitis severa de tipo granulomatoso, con zonas rodeadas de células mononucleares, células epiteloides y células gigantes tipo Langhans. Debido al hallazgo de LCTB se realizó un bacteriológico de micobacterias. Para ello, las muestras de tejidos fueron maceradas mecánicamente y el homogenato fue descontaminado a través del método de Petroff (NaOH 4%). Posteriormente, se inoculó el material por triplicado en medios de cultivos Stonebrink, revisándolos semanalmente durante 60 días. A los 45 días de cultivo, se observó el crecimiento de colonias de micobacterias procedentes de muestras de meninges y linfonodos mediastínicos, que fueron positivas a la tinción de ZN e identificadas y tipificadas (por PCR IS6110 y Spoligotyping, respectivamente) como *M. bovis*.

Discusión. Este reporte alerta sobre la presentación nerviosa de TB en la recría de terneras de remplazo en rodeos lecheros endémicos. La edad y los signos clínicos de la ternera evaluada fueron similares a otros reportes recientes de tuberculosis meníngea en Argentina (Llada et al., 2016) y Brasil (Konradt et al., 2016). Estos resultados indican que, mientras continúe el plan de control y erradicación de TB, la enfermedad debe ser considerada en el diagnóstico diferencial de bovinos con signos nerviosos.
El patrón de lesiones observado en cavidad torácica sugiere que la vía de infección fue respiratoria. Esta es la principal forma de transmisión de la TB debido, entre otras cosas, a la baja dosis infectiva requerida (Phillips et al., 2003). Asimismo, las condiciones de encierre en corrales, como la recría de este rodeo lechero, podrían hacer más efectiva la transmisibilidad. Sin embargo, también se ha descripto que terneros expuestos al consumo de leche contaminada por *M. bovis* pueden desarrollar lesiones pulmonares debido a que podrían aspirar leche cuando se alimentan con baldes (White and Minett, 1941). Es escasa la información sobre el mecanismo por el cual *M. bovis* accede al sistema nervioso central en bovinos. Sin embargo, la distribución de lesiones observada en la base del encéfalo de esta ternera sugiere que fue por vía hematógena, según lo propuesto por Oruç (2005). La bacteriemia podría haber ocurrido por el crecimiento y la erosión de los granulomas pulmonares.
La ternera investigada, cuando tenía tres meses de edad, había resultado negativa a la prueba de la tuberculina. Esto sugiere que podría haber adquirido la infección luego del diagnóstico. Sin embargo, también podría haber ocurrido que la infección haya sucedido previo al diagnóstico, pero la respuesta inmune aún no se había desarrollado (período pre alérgico). Algunos autores manifiestan que la hipersensibilidad a la tuberculina se desarrolla entre tres y seis semanas posteriores a la infección (de la Rua-Domenech et al., 2006). Por lo tanto, en rodeos lecheros donde hubo reaccionantes a la prueba de la tuberculina, es importante repetir el diagnóstico con un mínimo de 60 días y un máximo de 90 días hasta obtener al menos tres pruebas consecutivas negativas.

Conclusiones. En rodeos con TB endémica, pueden ocurrir casos de bovinos con signos neurológicos debidos a la infección por *M. bovis*. La repetición de la prueba de la tuberculina podría limitar la ocurrencia de estos casos.

Bibliografía. -LLadas, I, Olmos, L., Mazzanti, M., Cirone, K, Odriozola, E., Canton, G. 2016. Meningitis tuberculosa: Presentación de casos en terneras de un tambo. X Reunión Anual de Patología.
-de la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res. Vet. Sci.
-Konradt, G., Bassuino, D.M., Bianchi, M.V., Bandinelli, M.B., Driemeier, D., Pavarini, S.P., 2016. Neurotuberculosis in cattle in southern Brazil. Trop. Anim. Health Prod. 48, 1089–94.
-Phillips, C.J., Foster, C.R.., Morris, P.., Teverson, R., 2003. The transmission of Mycobacterium bovis infection to cattle. Res. Vet. Sci. 74, 1–15.
-Oruç, E., 2005. Meningoencephalitis tuberculosa in a holstein cow. Vet. Pathol. 42, 856–8.
-White, E.G., Minett, F.C., 1941. The pathogenesis of tuberculosis in the calf. Br. J. Tuberc. 35, 69–87.

Agradecimientos. Al veterinario privado y el productor agropecuario. Este trabajo formó parte del módulo diagnóstico del PNSA 1115054 y del módulo deenfermedades causadas por priones del PNSA N° 1115052 de INTA.

B13- ABORTO BOVINO POR *LISTERIA MONOCYTOGENES*: CONFIRMACIÓN BACTERIOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

I. Álvarez[1*], K. Cirone[1], A. Méndez[1], J. Maldonado[1-2], F. Cheuquepan[1], J. García[1], V. Scioli[1], G. Cantón[1], E. Morrell[1].
[1]INTA, EEA Balcarce. [2]Universidad de Cuenca, Ecuador.
*eeabalcarce.residsa@inta.gob.ar

Introducción

Listeria spp. es una bacteria ampliamente distribuida en el medio ambiente capaz de infectar a una gran variedad de especies, principalmente rumiantes domésticos. La listeriosis en rumiantes puede presentarse de diferentes formas clínicas: septicemia, encefalitis, mastitis, queratoconjuntivitis, uveítis y/o abortos. Los abortos suelen ser esporádicos, sin embargo hay registros de presentaciones epidémicas ("tormentas") asociadas al consumo de ensilados en mal estado. Además, *Listeria* es un agente zoonótico, con las implicancias asociadas a la salud pública. En la Argentina existen escasos reportes sobre abortos bovinos por *Listeria monocytogenes*. El objetivo de este trabajo es describir un caso diagnosticado en una vaca de cría, confirmado por diferentes pruebas de laboratorio en el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) del INTA Balcarce.

Materiales y métodos

En junio de 2018 se recibió un feto bovino abortado proveniente de un establecimiento de cría bovino ubicado en el partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires. El aborto ocurrió en una vaca Angus multípara consumiendo campo natural. Se efectuó el examen *post mortem* del feto y se extrajeron muestras de pulmón, contenido abomasal para cultivos microbiológicos. Además, se recolectó mucus cérvico-vaginal (MCV) y placenta, el mismo día de ocurrida la expulsión del feto. Una vez obtenido el aislamiento de *L. monocytogenes* se procedió a tomar muestras de endometrio mediante biopsia transvaginal, leche y materia fecal de la vaca abortada. Todas las muestras se cultivaron en agar sangre Columbia a 37ºC en aerobiosis. Las colonias de listeria fueron caracterizadas a nivel de especie utilizando pruebas bioquímicas convencionales y la prueba para evidenciar la generación del factor Christie–Atkins–Munch–Peterson (CAMP) en sinergismo con *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi* (cepas de referencia) cultivados en únicas estrías perpendiculares en agar sangre Columbia a 37ºC en aerobiosis. Se consideró reacción positiva cuando se observó una zona destacada de ß-hemólisis en la intersección de las cepas de prueba/control con las cepas indicadoras.

Del feto se extrajeron tejidos (tallo y corteza cerebral, cerebelo, pulmón, hígado, riñón, bazo, intestino, corazón, musculo retro-ocular, lengua, timo) y al igual que la biopsia endometrial se fijaron en formol tamponado al 4% para estudios histológicos. Secciones de pulmón, corazón, músculo retro-ocular y sistema nervioso central se tiñeron con Gram y se procesaron para inmunohistoquímica (IHQ) para detección de *L. monocytogenes.* Se utilizó un anticuerpo policlonal y un *kit* comercial (Dako EnVision+ System, USA). Con el objetivo de descartar otros agentes abortigénicos, se recolectaron muestras de bazo y cerebro para aislamiento de Herpesvirus bovino y del virus de la Diarrea viral bovina, cerebro para detectar *Neospora caninum* por PCR y líquido de cavidades para detectar anticuerpos a *N. caninum* por inmunofluorescencia indirecta, e improntas de bazo, pulmón, riñón e hígado para detectar *Leptospira* spp. por inmunofluorescencia directa .

Resultados

El feto tenía una edad gestacional estimada de 180 días y un avanzado grado de autólisis. Al examen *post mortem* se observó aparente esplenomegalia, sin otras lesiones macroscópicas de relevancia. Microscópicamente había infiltrado linfocítico multifocal leve en endocardio, pericardio, y en serosa de bazo e intestino, y presencia de colonias bacterianas intravasculares en todos los tejidos procesados. En submucosa de íleon se observó infiltrado linfocítico difuso moderado. Mediante la tinción de Gram se observaron cocobacilos Gram positivos en pulmón, corazón, músculo retro-ocular y sistema nervioso central. Los mismos tejidos fueron positivos a la inmunomarcación a *L. monocytogenes*.

Se aisló *L. monocytogenes* de contenido abomasal, pulmón, placenta, MCV y endometrio. Las colonias de bacilos Gram positivos desarrollaron a las 24 h de incubación en pureza siendo todas ellas β-hemolíticas y positivas a la prueba de CAMP, clasificándose bioquímicamente como *L. monocytogenes*. Los estudios virológicos, de *N. caninum* y de *Leptospira* spp resultaron negativos.

Discusión y conclusión

El aislamiento en varios tejidos fetales y maternos y la inmunomarcación positiva por IHQ confirman a *L. monocytogenes* como causal de este aborto.

Los abortos bovinos por esta bacteria generalmente son esporádicos, sin estar asociado a otra presentación en la hembra o la ingesta de alimentos contaminados. En más de 1000 fetos bovinos analizados en el SDVE durante los últimos 20 años, este es el segundo registro de aborto por *L. monocytogenes*, demostrando la baja incidencia de esta presentación clínica.

La confirmación bacteriológica y la IHQ en las diversas muestras confirman la capacidad para realizar bacteriemia de este agente. Debe recordarse el importante riesgo zoonótico que posee *L. monocytogenes,* por lo que toda persona que esté en contacto con abortos deberá tomar las medidas de precaución necesarias para evitar el contagio.

Bibliografía

Campero et al. 2002. J. Vet. Med. B49: 379-383
Johnson et al. 1995. J. Vet. Diagn. Invest. 7:223-228
Low et al. 1997. Vet. Journal. 153: 9-29
Margineda et al 2012. Rev. Vet. 23: 32-37

B14- LISTERIOSIS EN CAPRINOS: REPORTE DE CASO

C. Olguin Perglione[1,5], M.A. Fiorentino[2], M. Castillos[3], F. Delgado[4,5], S. Garbaccio[4,5], J. Schapiro[4,5], W. Morris[4,5], C. Garro[4,5]. [1]Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar, Buenos Aires; [2] Grupo de Sanidad Animal, E.A. INTA Balcarce, [3]Veterinario Privado, [4]Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA Castelar. [5]Grupo de Investigación Diagnóstica Veterinaria. Correo electrónico:
olguin.cecilia@inta.gob.ar

Introducción

La listeriosis es una enfermedad infecciosa zoonótica, que afecta a un amplio rango de animales. Esta enfermedad es causada por *Listeria monocytogenes (L. monocytogenes*), una bacteria Gram positiva, muy extendida en el medio ambiente (suelo, vegetación y agua) y que crece en un amplio rango de temperatura y pH. Los reservorios naturales de *L. monocytogenes* son el suelo y el tracto gastrointestinal de los mamíferos. La transmisión se da por vía fecal-oral, por ingestión de agua o comida contaminada, siendo los ensilajes y alimentos mal conservados contaminados por esta bacteria, las principales fuentes de infección en pequeños rumiantes. Existen tres formas clínicas de la enfermedad: la septicémica, que se da principalmente en animales jóvenes; la reproductiva, asociada a metritis, placentitis y abortos; y la nerviosa, forma más frecuente en rumiantes adultos, caracterizada por encefalitis y/o meningoencefalitis. En esta última forma, se ha propuesto que la bacteria ingresa a través de lesiones en la mucosa de la boca, y a través de los nervios craneales llega al sistema nervioso central donde produce la infección.

El objetivo de este trabajo es reportar un caso de listeriosis en una majada de cabras de raza Boer, en la provincia de Buenos Aires.

Materiales y métodos

El caso ocurrió en un establecimiento de 46 ha. ubicado en el partido de Exaltación de la Cruz, provincia de Buenos Aires, destinado a la cría de bovinos, caprinos, cerdos y equinos. Las cabras, de raza Boer, presentaban un adecuado estado corporal y eran alimentadas con pasturas, maíz, rollo y bagazo de cebada (subproducto de la industria de cerveza). En diciembre del año 2017, 7 de 17 cabras adultas presentaron un cuadro neurológico, ocurrido entre 15 y 30 días post parto y caracterizado por anorexia, ceguera, apoyo de la cabeza contra el alambrado, decúbito y muerte. Además, se registró la mortandad de cabritos lactantes sin signos clínicos previos. Los animales fueron tratados con oxitetraciclina, sin embargo no respondieron al tratamiento. De una de las cabras que murió luego de presentar el cuadro clínico descripto, se colectaron muestras de sistema nervioso central, pulmón, riñón, bazo, hígado e intestino, que se conservaron refrigeradas. Además, se obtuvieron muestras de sangre y materia fecal de 9 cabras adultas. Adicionalmente, se tomaron muestras del bagazo de cebada con el que eran alimentadas. Sobre las muestras de suero se realizó detección de anticuerpos contra el virus de Artritis Encefalitis Caprina y bioquímica sérica (calcio, fosforo y magnesio), mientras que sobre las muestras de órganos y el bagazo de cebada se realizó cultivo bacteriológico. Además, a partir de las muestras de materia fecal, se realizó un análisis coproparasitológico (recuento de huevos por gramo –HPG- y ooquistes por gramo –OPG-).

Resultados

Los valores medios (± DE) de calcio, fosforo y magnesio cuantificados en U/L fueron 10,8 ± 0,3; 8 ± 1,1 y 2,5 ± 0,5, respectivamente, dentro de los rangos considerados como de referencia. La serología para Artritis encefalitis caprina resultó negativa. El análisis coproparasitológico demostró que la mediana del recuento de HPG fue de 60 y de OPG fue de 120, valores considerados como carga parasitaria baja. A partir de las muestras de bazo y pulmón, no se aislaron bacterias aerobias ni micro-aerófilas de importancia clínica.

Se aisló e identifico la bacteria *Listeria monocytogenes* a partir de la muestra de sistema nervioso central, mientras que las muestras de bagazo resultaron negativas a esta bacteria.

Discusión y conclusiones

Los signos clínicos presentados en los animales junto al aislamiento de la bacteria *L. monocytogenes* de sistema nervioso central, confirman que se trató de un cuadro de listeriosis. De los alimentos consumidos por los caprinos en este establecimiento, el bagazo de cebada sería el de mayor riesgo como fuente de infección para los animales, ya que se encontraba expuesto a fermentación anaeróbica, lo que favorece el crecimiento de *L. monocytogenes.* Si bien no se pudo aislar *L. monocytogenes* a partir de las muestras de bagazo de cebada, el lote de alimento del cual se tomó la muestra era distinto al que habían consumido los animales al momento de ocurrencia de los signos clínicos. Sumado a esto, el parto y posparto son factores de estrés que podrían haber predispuesto a los animales para la ocurrencia del cuadro clínico. Por otro lado, los cabritos podrían haber desarrollado la enfermedad septicémica adquiriéndola por la ingestión de leche contaminada de cabras con bacteriemia. Si bien existen reportes bibliográficos donde se describe una mayor incidencia de esta enfermedad a fines de invierno-principios de primavera, en nuestro caso, y coincidiendo con reportes realizados en Brasil, este brote ocurrió a fines de primavera-principios de verano, lo que indicaría que no existe estacionalidad para que la misma se produzca. Luego de la ocurrencia de este brote se recomendó no utilizar el bagazo, no volviéndose a presentar nuevos casos.

Aunque el control de esta enfermedad es complejo, debido a que la bacteria es ubicua, una importante medida de prevención es evitar el uso de silos deteriorados y conservarlos en condiciones adecuadas para que mantengan su calidad.

Este reporte, alerta sobre la ocurrencia de listeriosis en cabras y resalta la importancia de la conservación de subproductos utilizados para la alimentación y de esa manera, evitar el impacto sanitario y económico que genera esta enfermedad.

Bibliografía

Fentahun T. and Fresebehat A. Listeriosis in Small Ruminants: A Review. Advances in Biological Research 6 (6): 202-209, (2012).

Headley S.A., Bodnar, L., Fritzen, J.T.T., Bronkhorst, D.E., Fernandes Alfieri A., Okano, W., Alfieri, A.A. Histopathological and molecular characterization of encephalitic listeriosis in small ruminants from northern Paraná, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 44, 3, 889-896 (2013).

B15- CONFIRMACIÓN DE UN BROTE DE TUBERCULOSIS AVIAR EN UN CRIADERO DE TRASPATIO

MB Riccio[1], E Galland[2], JP García[1], YD Huberman[3], FA Paolicchi[3], M Zumárraga[4], C Morsella[3], M Marfil[4], V Salazar[3], L Mendez, MF Herrera[5], MJ Traversa[6]

[1]Servicio de Diagnóstico Veterinario FCV Tandil. Facultad de Cs. Veterinarias. UNCPBA. Pinto 399. (7000) Tandil. Pcia. de Buenos Aires. [2], Actividad privada [3], INTA. EEA-Balcarce. Ruta 226 km 73,5. (7620) Balcarce. Pcia. de Buenos Aires, [4]INTA. Instituto de Biotecnología. Dr. Nicolás Repeto y De Los Reseros S/N°. (B1686IGC) Hurlingham. Pcia. de Buenos Aires, [5]Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Cs. Veterinarias. UNCPBA. Pinto 399. (7000) Tandil. Pcia. de Buenos Aires, [6]Laboratorio de Micobacterias. Dto SAMP. CIC. CIVETAN. CONICET. Facultad de Cs. Veterinarias. UNCPBA. Pinto 399. (7000) Tandil. Pcia. de Buenos Aires. mjt@vet.unicen.edu.ar

Introducción

La tuberculosis aviar es una enfermedad infecciosa crónica que afecta a las aves: domésticas, silvestres, de compañía y exóticas en cautiverio. Está prevalente en las aves de todo el mundo pero la especie *Gallus gallus* pertenece al grupo de aves consideradas altamente susceptibles, ya que dentro de la clase taxonómica aves existen grados de susceptibilidad diversos. Está causada por micobacterias que pertenecen al complejo *Mycobacterium avium* (MAC) y por *M. genavense*. El MAC incluye a patógenos de importancia para la medicina veterinaria y a patógenos facultativos de importancia para la salud pública. Al MAC pertenecen las subespecies *M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH) y *M. intracellulare*, presentando MAA y MAH positividad a PCR en el elemento repetitivo *IS*1245. La tuberculosis aviar es más frecuente en los sistemas productivos donde: la tasa de contacto es alta, las condiciones higiénicas sanitarias son pobres y hay presentes factores causales de estrés. Permitir a los planteles de aves domésticas convivir con animales de vida libre y mantener planteles de reproductores envejecidos son factores que predisponen la presencia de la enfermedad. La principal vía de transmisión de la infección es la digestiva y la fuente de infección son las aves enfermas (que pueden ser de vida libre o pertenecientes al criadero) con lesiones ulceradas en el tracto digestivo a partir de las cuales se eliminan micobacterias. Estos bacilos son capaces de sobrevivir en el medio ambiente jugando también éste un rol como fuente de infección. Los brotes de tuberculosis aviar se caracterizan clínicamente por la caída tanto en la producción de huevos como en el consumo de alimentos y el aumento en la tasa de mortalidad. Esta presentación clínica no es evidente porque en el brote coexisten animales que poseen una buena condición corporal y mantienen la postura, aun estando enfermos, con otros que presentan emaciación progresiva, debilidad y muerte a lo que se suma que la signología clínica no es patognomónica. Esta manifestación en el brote sucede porque pueden existir aves transitando cualquiera de las tres fases de la enfermedad ya sea la de latencia, la del desarrollo de las lesiones o la del período de caquexia. En esta última fase se presentan granulomas que según la forma de la enfermedad pueden distribuirse en múltiples órganos o limitarse al tracto digestivo. Algunas aves pueden presentar signología respiratoria con muerte súbita y también se han notificado granulomas oculares y dérmicos. Es por ello que el objetivo del presente trabajo es describir y confirmar un brote de tuberculosis aviar en un criadero de aves de traspatio de la provincia de Buenos Aires.

Materiales y métodos

Se estudiaron las muestras provenientes de lesiones compatibles con tuberculosis aviar presentes en el tracto digestivo de dos aves adultas a las cuales se les realizó la necropsia. Ambas gallinas presentaban emaciación, apatía, palidez de cresta y barbillones. Las aves pertenecían a un criadero en el cual se observó en el trascurso de dos meses una mortandad de 60 aves de 300 totales. Otros signos clínicos registrados fueron la disminución de la postura y diarrea sanguinolenta. Las aves habitaban un recinto con techo y cajas de postura, con alambre tejido perimetral, la alimentación era con alimento balanceado y carecían de un plan sanitario. Durante la necropsia se observó caquexia, atrofia de músculos pectorales y de ovarios, hepatomegalia, hígados friables y esplenomegalia. Además en los sistemas digestivo, respiratorio y urinario se registraron granulomas de tamaño variable color blanco amarillento distribuidos de manera multifocal a coalescente. Las muestras de las lesiones se colocaron en solución de formol al 10% para los estudios histopatológicos y sin fijar para los estudios bacteriológicos. Las muestras fijadas fueron utilizadas para realizar una primera confirmación microscópica en la cual las improntas directas se colorearon con la tinción de Ziehl Neelsen (ZN) (Biopack®), también se procesaron utilizando la técnica de parafina estándar y las secciones fueron coloreadas con las tinciones de hematoxilina eosina (HE) y de ZN. Las muestras sin fijar fueron tratadas para el aislamiento de microorganismos aerobios y de micobacterias. A partir de los aislamientos compatibles con microorganismos del género *Mycobacterium* se realizó PCR para detectar la secuencia de inserción *IS*1245.

Resultados

En las secciones coloreadas con HE se diagnosticó hepatitis, tiflitis, enteritis y nefritis, aerosaculitis y neumonía granulomatosa multifocal severa. En la mayoría de los órganos se observó el reemplazo de la arquitectura tisular normal por granulomas con núcleo central necrótico, restos celulares eosinofílicos y núcleos cariorrécticos. Alrededor de éstos se encontraron macrófagos epitelioides y células gigantes multinucleadas de tipo Langhans y de cuerpo extraño que presentaron espacios claros en el citoplasma. Los macrófagos estaban delimitados por fibroblastos reactivos y tejido conjuntivo fibroso mezclado con linfocitos y células plasmáticas. En las coloraciones de ZN de las improntas y de las secciones de los órganos se observó la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes. El diagnóstico macro y microscópico de tuberculosis fue confirmado con el aislamiento bacteriológico de *M. avium* positivo al fragmento *IS*1245. También se aislaron *E. coli* y *Riemerella anatipestifer* en el tracto digestivo y *Pasteurella multocida* en el tracto respiratorio y no se detectó *Salmonella* spp. En el hábitat estudiado se registró que a pesar que se mantenían las condiciones nutricionales adecuadas estaban presentes factores como: ausencia de plan sanitario, falta de bioseguridad y libre contacto con aves silvestres.

Discusión

En este brote se confirmó la presencia de *M. avium IS*1245+ como agente causal de tuberculosis aviar en dos aves pertenecientes a un criadero que presentó una mortandad del 20% en el transcurso de dos meses, la que es considerada alta. También se aislaron otras especies microbianas patógenas facultativas para las aves lo que permitiría reflejar la presencia de una coinfección. Es posible que en el futuro esta clase de presentaciones clínicas aumente su frecuencia en los sistemas de producción avícola dedicados a aves ponedoras si se mantiene la tendencia actual de utilizar huevos producidos “cage-free” y en condiciones de baja bioseguridad.

Bibliografía

1. Dhama K, Mahendran M, Tiwari R, Singh SD, Kumar D, Singh S, Sawant PM. 2011. Tuberculosis in Birds: Insights into the *Mycobacterium avium* Infections. Vet Med Int. Article ID 712369. 14 pages. doi:10.4061/2011/712369

2. Zhu L, Peng Y, Ye J, Wang T, Bian Z, Qin Y, Zhang H, Ding J. 2018. Isolation, Identification, and Characterization of a New Highly Pathogenic Field Isolate of *Mycobacterium avium* spp. *avium.* Front. Vet. Sci. 4:243. doi: 0.3389/fvets.2017.00243

3. Imperiale BR, Moyano RD, Di Giulio AB, Romero MA, Alvarado Pinedo MF, Santangelo MP,Travería GE, Morcillo NS, Romano MI. 2017. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* complex strains isolated in Argentina by MIRU-VNTR. Epidemiol. Infect. 10 pages. doi:10.1017/S0950268817000139

B16- CARACTERIZACIÓN ESPACIAL, TEMPORAL Y POR TIPO DE MUESTRA CLÍNICA DE CEPAS DE *CAMPYLOBACTER FETUS* AISLADAS DE RODEOS BOVINOS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

M.L. Chiapparrone [1], C. Morsella [2], F. Moreno [3], F. Paolicchi [2], P. Soto [4, 5], M. Catena [1, 5]
1 Área de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. 2 Laboratorio de Bacteriología. Departamento de Producción Animal. EEA INTA Balcarce. 3 AER INTA Tandil. 4 Área de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. 5 NACT - SAMP. Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN) – CONICET.
mlchiapp@vet.unicen.edu.ar

Introducción.

La campylobacteriosis genital bovina causada por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* y *Campylobacter fetus* subsp. *fetus,* es una enfermedad reproductiva de transmisión venérea que se caracteriza por producir pérdidas en la gestación temprana y abortos (Garcia *et al.*, 1983). La ausencia de un plan oficial de control de la enfermedad determina que en la mayoría de los casos la información disponible surja del análisis de muestras clínicas de rutina derivadas a laboratorios diagnósticos privados. En la bibliografía consultada, en la provincia de Buenos Aires sólo se registraron relevamientos mediante la aplicación de la técnica de inmunofluorescencia directa para *C. fetus* utilizada de rutina. Los boletines y las comunicaciones emitidas por los laboratorios diagnósticos que realizan identificación bacteriana, son las únicas referencias bibliográficas referidas a la presencia de las subespecies en los rodeos de nuestra región ya que la técnica de inmunofluorescencia directa no diferencia las subespecies de *C. fetus.* La importancia de evaluar la distribución de los microorganismos a través del tiempo y espacio, radica en la posibilidad no sólo, de formular hipótesis sobre el origen de las enfermedades, sino también determinar patrones de distribución que permitan identificar factores de riesgo asociados a su presentación. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar cepas de *Campylobacter fetus* aisladas de rodeos bovinos de la provincia de Buenos Aires de acuerdo a la localidad geográfica, el año y la muestra clínica de aislamiento.

Materiales y métodos

Noventa y cinco cepas de *C. fetus* aisladas de bovinos, fueron seleccionadas a partir de un total de 159 aislamientos registrados entre los años 1999 y 2014 en el Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNCPBA) sito en la ciudad de Tandil y el Laboratorio de Bacteriología (EEA-INTA Balcarce). Las cepas fueron seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios: localidad geográfica, año y muestra clínica de aislamiento. Con respecto a la localización geográfica, se consideró el partido del cual provenían las muestras. Para los años de aislamiento y con el objetivo de realizar un estudio observacional de la evolución de las cepas a lo largo de los años, se seleccionaron las mismas de manera tal que se tuviera información de años sucesivos, evitando datos aislados en el tiempo que impidieran realizar una evaluación continua. Las muestras clínicas: esmegma prepucial de toros (n=10), semen criopreservado (n=1), mucus cérvico vaginal de hembras (35), placenta (1), líquido abomasal y pulmón de fetos abortados (n=48).

Las cepas conservadas en nitrógeno líquido como primoaislamientos para su posterior caracterización, fueron descongeladas en baño María a 37 ºC, sembradas en placas con medio Skirrow (Skirrow, 1977) y cultivadas en condiciones de microaerofilia (5% de O_2, 10% CO_2 y saturación con N_2) por 72 h a 37 ºC. La identificación de género, especie y subespecie bacteriana se realizó mediante pruebas bioquímicas (On, 1996; Carter, 2004; Vandamme *et al.,* 2005).

La distribución temporal y por muestra clínica de origen de las subespecies *de C. fetus* fueron descriptas mediante gráficos del programa Excel, mientras que para la visualización espacial se utilizó el software QGis tomando como localización geográfica al centroide del partido de origen de las cepas.

Resultados

De la totalidad de las cepas analizadas, 50 (52,6%) fueron clasificadas como *C. fetus* subsp. *fetus,* 40 (42,1%) como *C. fetus* subsp. *venerealis* y 5 (5,3%) como *C. fetus* subsp. *venerealis* biotipo *intermedius.*

Noventa y tres, pertenecen a rodeos bovinos de diferentes partidos de la provincia de Buenos Aires con una amplia dispersión geográfica, no obstante los partidos con mayor número de cepas fueron Tandil, Balcarce y adyacentes. Las dos cepas restantes, a las provincias de Córdoba y Corrientes. De las 95 cepas, 94 pertenecen a rodeos de cría, la cepa restante fue aislada de un tambo. En los 15 años de análisis, se registró la presencia de ambas subespecies con un predominio de *C. fetus* subsp. *fetus* en siete años. Desde 2007 hasta la finalización del período en estudio, no se aislaron cepas de *C. fetus* subsp. *venerealis* biotipo *intermedius*. El mayor número de cepas de *C. fetus* subsp. *fetus* fueron aisladas de fetos y de *C. fetus* subsp. *venerealis* de hembras y toros.

Discusión y conclusión

En la bibliografía consultada no se encontraron registros de análisis de ceparios de *C. fetus,* sólo algunos referidos al estudio de cepas aisladas de casos clínicos individuales. En cuanto a la localización geográfica, la mayoría de las cepas fueron aisladas de muestras provenientes de los partidos de Balcarce, Tandil y adyacentes, debido a la cercanía a ambos laboratorios. El mayor número de cepas de *C. fetus* aisladas de bovinos de producción de carne, se relacionaría con el predominio del servicio natural sobre la IA en rodeos de cría, a diferencia de lo que sucede en los sistemas de producción lechera. Si bien en la actualidad en Argentina, los centros de IA incluyen una amplia variedad de análisis de calidad del semen, es de fundamental importancia el uso de pajuelas controladas mediante análisis microbiológicos para la detección de los patógenos de la reproducción y oportunistas, más aún si consideramos que la IA se incluye dentro de los procedimientos de prevención de la transmisión de la enfermedad. Se registró una cepa de *C. fetus* aislada de una pajuela de semen criopreservado, este hallazgo probablemente refleje la baja frecuencia con que se realiza el análisis microbiológico de semen. La única cepa perteneciente a un sistema de producción lechera, fue aislada a partir de una muestra de mucus cérvico vaginal de una vaca abortada que recibió servicio natural con un toro portador de *C. fetus.*Si bien en el período de tiempo en estudio se observó la presencia de ambas subespecies de *C. fetus,* en 7 años se registró un predominio de *C. fetus* subsp. *fetus* en coincidencia con los reportes que indican a nivel nacional mayor casuística para esta subespecie.

En relación a las muestras clínicas de origen, el mayor número de aislamientos de *C. fetus* subsp. *fetus* aislados de fetos y de *C. fetus* subsp. *venerealis* aislados de hembras y toros, se relacionaría con lo citado por la bibliografía que *C. fetus* subsp. *fetus* se asocia más con los casos de abortos mientras que *C. fetus* subsp. *venerealis* con las fallas reproductivas tempranas (Garcia *et al.*, 1983).

Bibliografía

Carter, M. E., Chengappa, M.M., Roberts, A.W. (2004). *Campylobacter* and *Helicobacter*. 184-186. In: Essentials of Veterinary Microbiology. Fifth edition Wilkins, W.

Garcia, M.; Eaglesome, M. & Rigby, C. (1983). *Campylobacter* important in veterinary medicine. Veterinary Bulletin, 53, 793-818.

On, S. (1996). Identification methods for Campylobacters, Helicobacters and related organisms. Clinical Microbiology Reviews, 9, 405-422.

Vandamme, P.; Dewhirst, F. E.; Paster, B. J. & On, S. L. W. (2005). Familia *Campylobacteraceae.* Género *Campylobacter.* 1145-1160. In: Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology. Second edition Brenner, D. J.; Krieg, N. R. & Staley, J. T. Springer.

B17- AISLAMIENTOS MICROBIOLÓGICOS EN LECHES DE CABRAS CON MASTITIS CLÍNICA Y CLÍNICAMENTE SANAS DE PRODUCTORES FAMILIARES DEL NOROESTE DE CÓRDOBA, ARGENTINA.

E. Sticotti[1], A. Salinas[1], W. Alvarado[1], M. Macio[1], M. Schneider[1], G. Magnano[1], V. Nievas[1], C. Rang[1], C. Sturniolo[1], J. Fernandez[1], P. Toranzo [5], B. Agnelli[2,5], L. Aparicio[2], F. Sarri[2], M. Fernández[3], C. Gramaglia[4], J. Giraudo[1].
[1]Universidad Nacional de Rio Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC-FAV). [2]Sub-Secretaría de Agricultura Familiar (SsAF). [3]Servicio Nacional de Sanidad y calidad Agroalimentaria (SENASA). [4]Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). [5]Movimiento Campesino de Córdoba. esticotti@ayv.unrc.edu.ar

Introducción

La mastitis en los hatos caprinos afecta negativamente a la producción ya que provoca una disminución drástica de la producción de leche, aumenta el riesgo de muerte en los cabritos, requiere mayor atención en la alimentación artificial de las crías y aumentan los descartes debido a cuartos perdidos por mastitis clínica (Bazan *et al*, 2009); todo esto convierte a la mastitis en un problema grave para la producción lechera caprina a nivel mundial. (Sánchez *et al*, 2014). En Argentina es una de las cinco enfermedades de mayor prevalencia en el oeste pampeano, con un 60,4% de las majadas con algún tipo de problema (Bedotti *et al*, 2002).

Objetivo: Estimar la prevalencia de MC en productores caprinos lecheros ubicados en el oeste de la provincia de Córdoba y estudiar los agentes aislados en leches con mastitis clínica (MC) y glándulas clínicamente sanas.

Materiales y métodos

Se trabajó en 58 establecimientos de productores caprinos en el mes de junio del año 2018. Los mismos tienen un sistema semi extensivo a pastizal natural y encierre nocturno en los departamentos de San Alberto, San Javier, Pocho, Minas y Cruz del Eje de la provincia de Córdoba. Se ordeña manualmente una vez al día para producción de quesos en forma artesanal, para autoconsumo y venta en mercado local informal.

El criterio de muestreo fue colectar muestras de la totalidad de cabras con MC y de 5 cabras en lactancia y clínicamente sanas. Se indagó en cada hato si había cabras con MC y luego se examinaron clínicamente, evaluando los siguientes parámetros: aumento de tamaño de las mamas, temperatura local, rubor, presencia de alteraciones en el parénquima mamario y cambios en la secreción. Con la presencia de uno o más de estos parámetros se califico al cuarto con MC.

De un total de 3523 reproductoras, se colectaron un total de 204 muestras, de las cuales 33 fueron de cuartos individuales con MC y las 171 restantes pertenecían a cabras sin síntomas clínicos de MC (muestra a nivel cabra).

Se recolectaron 10 ml de leche en recipiente estéril, previo descartar los primeros chorros y desinfección de los pezones. Las muestras fueron mantenidas refrigeradas hasta su procesamiento en el laboratorio. Cada muestra fue inoculada en placas de Agar Sangre y Mac Conkey e incubadas a 37°C por 36 horas. Luego de leer las placas se procesaron las diferentes colonias para su clasificación, aplicando los esquemas de identificación convencionales.

Resultados

La prevalencia de MC fue de 0,93% (33/3523).

De las 33 muestras de MC 21 resultaron negativas, en 3 de estas se aisló *Staphylococcus aureus, en 4 Staphylococcus* coagulasa negativa (no aureus), en 4 *Streptococcus sp* (ambientales) y en 1 *Corynebacterium bovis* (Figura 1)

De las 171 muestras de cabras clínicamente sanas, los resultados bacteriológicos fueron: 119 resultaron negativas, en 33 se aisla *Staphylococcus* coagulasa negativa (no aureus*)*, en 6 *Staphylococcus aureus, en 1 Streptococcus sp (ambiental)*, en 1*Serratia marcescens, en 1 Klebsiella sp. y* en 1*Shigella sp y* 8 muestras estaban contaminadas. (Figura 2).

Discusión y conclusión

La prevalencia de MC obtenida, fue menor que la reportada en un trabajo realizado en sistemas de producción similares, donde se encontró una prevalencia de MC de 3.24% (Sicottti *et al*. 2015). Esta diferencia puede justificarse porque en el muestreo realizado en 2015 no todas las cabras habían parido.

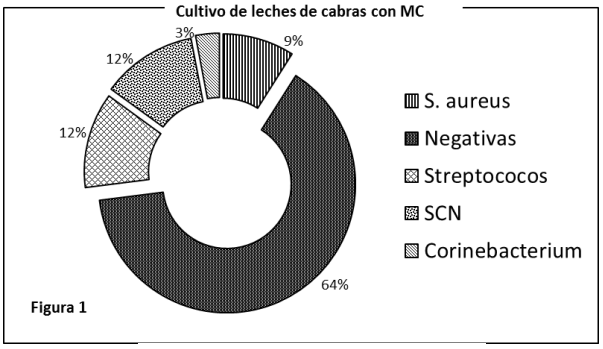


Figura 1

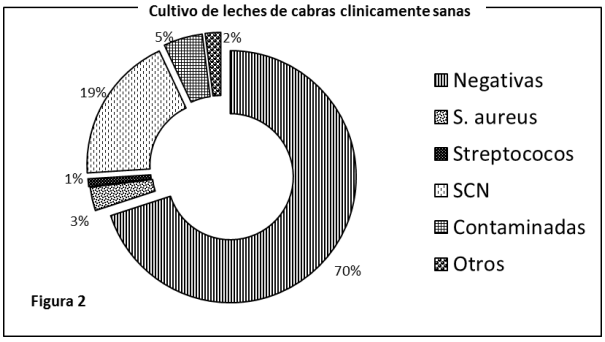


Figura 2

Si nos referimos a los agentes aislados, los resultados son similares a los encontrados por Suarez *et al.,* (2012), que analizaron 845 muestras, 50 resultaron positivas a agentes responsables de mastitis caprina (5,91%) y el agente mas prevalente fue el *Staphylococcus* coagulasa negativo (no aureus).En la bibliografía nacional se encuentran escasos reportes de MC en esta especie; incluso no se encontraron datos en similares sistemas de producción; por lo tanto, creemos que hay que profundizar estudios de esta afección en el sector lechero caprino en el país.

Bibliografia

Bazan, R., Cervantes, E., Salas, G., Segura-Correa J. 2009. Prevalencia de Mastitis Subclínica en Cabras Lecheras en Michoacán, México. Revista Científica: Maracaibo. Universidad del Zulia Venezuela. Vol. XIX, Núm. 4, pp. 334-338.

Bedotti, D; Sanchez Rodriguez, M. 2002.Aproximación a la problemática sanitaria del ganado caprino en el oeste pampeano. EEA Anguil. http://produccionanimal.com.ar/enfermedades _caprinos/18-sanidad_en_oeste_pampeano.

Sánchez, A., Contreras, A., Jimenez, J., Corrales, C. 2014. Effect of freezing goat milk samples on recovery of intramammary bacterial pathogens.

Sticotti, E; Macio, M; Vissio, C; Claudio, B; Magnano, G; Macias A; Rang, C; Schneider, M; Giraudo J. 2015. Prevalencia de mastitis clínica en cabras en el departamento Belgrano, provincia de San Luis, Argentina. II Congreso de producción caprina. La Rioja. Argentina.

Suarez, V.H., Martinez, G.M., Gianre, V., Calvinho, L., Rachoski, A., Chavez, M., Salatin, A., Orozco, S., Sanchez, V., Bertoni, E. Etiología y diagnóstico de mastitis subclínicas en cabras lecheras. 2014.“Sanidad ovina y caprina”, “Calidad de leche” - www.researchgate.net/profile/Mastitis/9c9605255a20f9bd2b.doc

B18- MASTITIS TUBERCULOSA EN BOVINOS DE LECHE: REPORTE DE CASOS

Garro, C.[1], Delgado, F. [1], Zumárraga, M.[2], Marfil, J. [2], Garbaccio, S. [1].
1. Instituto de Patobiologia. CICVyA - INTA. 2. Instituto de Biotecnología. CICVyA - INTA. garro.carlos@inta.gob.ar

Introducción. La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad del ganado producida principalmente, por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Aunque es conocido el riesgo de infección en terneros asociados al manejo del calostro y leche (Evangelista and De Anda, 1996), la utilización de leche cruda es frecuente en rodeos lecheros de la región (Garro et al., 2010). Sin embargo, es escasa la información sobre la ocurrencia de mastitis por TB. El objetivo de este estudio es describir las características patológicas y epidemiológicas de cuatro casos de mastitis tuberculosa en bovinos de producción de leche.

Materiales y métodos. El estudio se realizó en dos rodeos lecheros (rodeo A y rodeo B) de la provincia de Buenos Aires. Al momento del estudio, ambos rodeos alimentaban a sus terneras con leche cruda y tenían antecedentes de resultados positivos a la prueba de la tuberculina en terneras de 3 meses de edad. La prevalencia de TB en vacas adultas (determinada con la prueba de la tuberculina aplicada en el pliegue ano-caudal) fue del 10% (81/809) en el rodeo A y del 6% (34/617) en el rodeo B. En el rodeo A, ubicado en el partido de Lincoln, fue analizada una vaca de raza Jersey (caso 1) en agosto 2014. En el Rodeo B, ubicado en el partido de Bolivar, fueron analizadas tres vacas de raza Holando argentino (caso 2, 3 y 4), en junio 2016. Los casos evaluados fueron positivos al diagnóstico de TB, no tenían diagnóstico clínico de mastitis y no estaban preñadas. Para confirmar la infección por *M. bovis*, se realizó la eutanasia y necropsia. Las características fisiológicas de los casos estudiados al momento de la necropsia se describen en la tabla 1.

	Edad (años)	Número de lactancia	DUL (meses)	Período
Caso 1	7	5	3	Lactación
Caso 2	5,6	3	12	Seca
Caso 3	5	3	9	Lactación
Caso 4	10	5	26	Lactación

Tabla 1: Características de los bovinos de leche analizados. DUL = Duración de la última lactancia.

La glándula mamaria (GM) y los linfonodos (LNs) retromamarios fueron separadas cortando los ligamentos suspensorios y examinados en busca de alteraciones externas. Luego fueron separados los cuartos izquierdos y derechos a través del ligamento suspensorio medio y se realizaron cortes transversales múltiples en cada cuarto. Además, se inspeccionaron la cavidad torácica y abdominal. Toda estructura (focal o multifocal), de color blanco amarillento, circunscrito, con o sin mineralización, fue considerada como lesión compatible con TB (LCTB). Se colectaron muestras de tejidos de GM y LNs retromamarios para su estudio bacteriológico e histopatológico. Para el análisis bacteriológico, las muestras fueron procesadas y cultivadas por triplicado en medios de Stonebrink. Las colonias luego fueron coloreadas por el método de Ziehl-Neelsen e identificadas y tipificadas por PCR IS6110 y Spoligotyping, respectivamente. Para el análisis histopatológico, las muestras fueron fijadas en formaldehído al 10% y procesadas por las técnicas de rutina.

Resultados. En el caso 1, se observó en GM una lesión fibrosa y compacta, de color grisáceo amarillento en el cuarto mamario caudal izquierdo. La histología del cuarto afectado reveló la característica lobular normal de GM pero con aumento del tejido fibroso interlobular y acúmulos intercéptales de leucocitos. Ambos LNs retromamarios presentaban focos de necrosis caseosa de 0,5 cm de diámetro. Los casos 2, 3 y 4 presentaron LCTB similares en GM que involucraban los cuartos mamarios caudales con pérdida de la estructura lobular, necrosis, zonas confluyentes con licuefacción y lóbulos encapsulados con signos de calcificación. La histología de GM reveló en estos casos, acinos ocupados por un coloide homogéneo, con material que contenía células mononucleares, células epiteloides y células gigantes tipo Langhans. El epitelio secretor de los lóbulos afectados se observó inactivo y lindante a lóbulos secretores. Los LNs retromamarios mostraron múltiples nódulos caseosos multifocales de entre 1 y 3 cm de diámetro. En los 4 casos, se observaron además LCTB en LNs retrofaríngeos, traqueobronquiales, mediastínicos y pulmones. Además, los casos 1, 3 y 4 presentaron LCTB en mesenterio y LNs mesentéricos. En los 4 casos, se pudo aislar colonias de micobacterias procedentes de GM y LNs retromamarios, que fueron identificadas como *M. bovis*.

Discusión. Este reporte alerta sobre la presentación de TB en GM en bovinos de rodeos lecheros endémicos. En todos los casos, las lesiones en GM fueron acompañadas por lesiones en cavidad torácica lo cual sugiere que la infección de la misma, ocurre por diseminación hematógena. Las características patológicas de las lesiones en GM, sugieren una extensión de la infección a través de los conductos galactóforos. Stamp (1943) reportó que hasta el 44% de las vacas con LCTB en cavidad torácica presentaban lesiones en GM mencionando la posibilidad de que la misma, sea uno de los órganos más comúnmente afectado luego del pulmón. La organización de las lesiones observadas, junto a los datos de edad y número de lactancia, sugieren que la mastitis tuberculosa es un proceso de desarrollo crónico. La infección de los LNs retromamarios, observada en todos los casos, sería secundaria a la infección de la GM. Este estudio sugiere además que la transmisión por leche de *M. bovis* podría ser un modo importante de transmisión intra-rodeo. Cabe destacar que las lesiones tuberculosas en GM se encontraban rodeadas por tejido glandular funcional, por lo que era probable la contaminación de la leche por *M. bovis*. Y en tres de los cuatro casos las vacas estaban en el periodo de lactación, con el riesgo que esto conlleva para la diseminación. En algunos rodeos lecheros, la leche no apta para comercializar (proveniente de vacas en transición, con mastitis y/o bajo tratamiento farmacológico) suele ser utilizada para alimentar a los terneros lo que aumentaría el riesgo de transmisión en rodeos con TB. La frecuente utilización de leche cruda para alimentar a los terneros (Garro et al., 2010), la detección de *M. bovis* en leche (Garbaccio et al., 2018) y los hallazgos de este estudio, contribuyen a destacar la importancia del riesgo de diseminación de la infección a través de leche cruda. La misma, es un reconocido factor de riesgo para la transmisión de la infección en terneras (Evangelista and De Anda, 1996) y cuya ocurrencia, ha sido sugerida en reportes locales (Garro et al., 2011). En los casos de TB en GM, la leche puede aparentar inalterada en su aspecto externo. Por lo tanto, la implementación de equipos de pasteurización de leche y/o el uso de sustitutos lácteos podría ser una herramienta importante para limitar la transmisión de TB en rodeos lecheros endémicos. La implementación de estas medidas, junto a la aplicación sistemática del diagnóstico de TB, podría contribuir a un eficiente control de la TB de los rodeos lecheros.

Conclusion. La detección de mastitis tuberculosa alerta sobre la transmisión de *M. bovis* a terneras de reemplazo a través de leche cruda.

Bibliografía

Garbaccio, S., Delgado, F., Zumarraga, M., Huertas, P., Garro, C., 2018. Diagnostico bacteriologico de tuberculosis bovina en reactores positivos a la prueba intradermica. Rev. Investig. Agropecu. 44, 69–75.

Evangelista, T.B.R., De Anda, J.H., 1996. Tuberculosis in dairy calves: risk of Mycobacterium spp. exposure associated with management of colostrum and milk. Prev. Vet. Med. 27, 23–27.

Garro, C., Morris, W., Delgado, F., Garbaccio, S., 2011. Tuberculosis bovina en terneros. Vet. Argentina 28.

Stamp, J.T., 1943. Tuberculosis of the Bovine Udder. J. Comp. Pathol. Ther. 53, 220-IN21.

Garro, C., Abdala, A., Garbaccio, S., Spath, E., Leon, E., Paolicchi, F., 2010. Factores de riesgo de tuberculosis bovina en rodeos lecheros de las provincias de Córdoba y Santa Fe. Rev. Argentina Prod. Anim. 30, 167–178.

B19- EFICACIA DE LA OXITETRACICLINA E IMIDOCARBO PARA LA ESTERILIZACIÓN DE ANIMALES PORTADORES DE *ANAPLASMA MARGINALE.*

M.Sarli[1,2], M.B. Novoa[1,2], M.N. Mazzucco[1], S. Torioni de Echaide[1], M.E. Primo[1,2], I.E. Echaide[1]
[1]Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Rafaela, [2]CONICET. sarli.macarena@inta.gob.ar

Introducción

La anaplasmosis bovina es una enfermedad hemoparasitaria producida por la *Rickettsia Anaplasma marginale*, bacteria que se multiplica en los eritrocitos y se transmite a través de artrópodos hematófagos y fómites. Es una enfermedad anemizante de alta letalidad en adultos, los bovinos que sobreviven la etapa aguda, se transforman en portadores asintomáticos y fuente de infección para sus transmisores. Está ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales del mundo, en expansión hacia zonas templadas. En Argentina se la ha diagnosticado en áreas no endémicas, donde se requiere del tratamiento esterilizante de los portadores para evitar la difusión de la enfermedad. Se han evaluado diferentes protocolos para la esterilización de la anaplasmosis, basados en el uso de antibióticos y quimioterápicos en la etapa crónica de la enfermedad, con resultados contradictorios. En este trabajo se evaluó la eficacia de la oxitetraciclina (OTC) y el imidocarbo (IMC) para eliminar el estado de portador asintomático (crónico) de *Anaplasma* spp. en novillos infectados en forma experimental.

Materiales y métodos

Infección. Veinte novillos Holstein de 2 años de edad libres de anaplasmosis, establecido mediante un ELISA (punto de corte 25% de positividad), y *nested* PCR (nPCR), se infectaron con la cepa M1P de *A. marginale*. Cada novillo se inoculó por vía SC con 10^7 eritrocitos parasitados (EP), obtenidos de un ternero esplenectomizado e infectado en forma experimental con dicha cepa. El curso de la infección aguda en los novillos se evaluó diariamente a través de los parámetros clínicos, incremento de la temperatura rectal (TR) >39,5°C, incremento del % de EP (%EP), y depresión del hematocrito (Ht). Los animales fueron tratados con una dosis de 20 mg/kpv OTC-LA por vía IM, cuando la TR fue ≥41ºC, %EP ≥5% y/o el Ht ≤15%. En todos los casos se obtuvo la media (±SEM).

Esterilización. A los 78 días pos inoculación (dpi) con *A. marginale*, cuando el % EP fue <0,5% (etapa crónica), los novillos se distribuyeron al azar en dos grupos (GA y GB), de 10. Cada novillo del GA recibió tres dosis de 20 mg/kpv de OTC (Terramicina® LA, *Pfizer)*, IM, los días 0, 7 y 14. Cada bovino del GB recibió dos dosis de 5 mg/kpv de IMC (Imizol®, *Shering-Plough Animal Health*), IM, los días 0 y 14. Para confirmar la eficacia del tratamiento esterilizante, muestras de sangre se evaluaron cada 7 días mediante ELISA y nPCR durante 60 días y posterior inoculación en terneros esplenectomizados (TE).

Subinoculación. Sangre con anticoagulante (50 ml) de los novillos tratados, se inoculó por vía SC en TE libres de anaplasmosis. Basados en ELISA y nPCR el experimento se continuó sólo con los novillos del GA (OTC). Las subinoculaciones se realizaron a los 118 días pos tratamiento (dpt). El TE_1 se inoculó con un *pool* de sangre de 3 novillos negativos por ELISA y por nPCR. El TE_2 se inoculó con un *pool* de sangre de 2 novillos negativos por ELISA y sospechosos por nPCR. El TE_3 se inoculó con sangre de un novillo negativo a ELISA entre los 42 y 82 dpt, que luego mostró seroconversión positiva y nPCR positiva. El TE_4 recibió sangre de un novillo que se mantuvo positivo por ELISA y nPCR durante todo el ensayo. Cada TE fue controlado clínicamente y mediante ELISA y nPCR durante 90 días.

Resultados

Infección por A. marginale. La reacción clínica fue patente en el 100% de los novillos (frotis), entre los 20 y 41 dpi y todos generaron un nivel de anticuerpos promedio de 96%P±6,1% (ELISA) a los 35 dpi (Fig. 1), y fueron nPCR+ desde los 14 dpi. El aumento máximo del %EP fue 6,5±0,2%, el descenso máximo del Ht fue 48,3±1,1% y el incremento máximo de la TR fue de 1,0±0,2%.

Esterilización. En el dpt 0, 18/20 y 20/20 novillos fueron positivos por ELISA y nPCR, respectivamente. A los 109 dpt, 5/10 novillos del GA (GA_1) fueron negativos por ELISA y negativos (n=3) o sospechosos (n=2) por nPCR. Los restantes 5 (GA_2) resultaron positivos por ELISA durante todo el ensayo (n=3) o fueron negativos entre los 42 y 82 dpt seguidos de seroconversión positiva (n=2) y nPCR positiva (Fig. 1). Hubo diferencia significativa ($p<0,05$) entre los niveles promedio de anticuerpos de los bovinos del GA_1 y GA_2. Sólo 1/10 bovinos del GB, resultó negativo por ambas pruebas, por ello la subinoculación en TE se realizó sólo con los novillos del GA.

Subinoculación. En los TE1 y TE2, no se detectó *A. marginale;* los parámetros clínicos evaluados fueron normales y ELISA y nPCR resultaron negativos durante los 90 dpi. En los TE3 y TE4 se observaron EP con *A. marginale* en frotis a los 19 dpi, las pruebas de ELISA y nPCR también resultaron positivas.

Conclusión

El tratamiento con OTC fue eficaz en el 50% de los bovinos tratados mientras que el tratamiento con IMC fue ineficaz para la esterilización de la anaplasmosis. En ambos casos, las diferencias respecto a lo reportado en la bibliografía, podrían deberse al período de tiempo seleccionado entre la inoculación y el tratamiento y/o éste y la subinoculación, así como al nivel de susceptibilidad de las diferentes cepas de *A. marginale* a los antimicrobianos. El período de extinción de los anticuerpos fue menor que el del ADN, sin embargo, las reacciones sospechosas por nPCR no se correlacionaron con la viabilidad de *A. marginale*. La serología sería de utilidad para monitorear el tratamiento esterilizante a partir de los 50 días de iniciado el mismo. No se descarta que la seroconversión positiva detectada en los dos bovinos del GA_2, respondieran a reinfecciones naturales por *A. marginale* dado que los 20 bovinos compartían el espacio. Resta evaluar el momento óptimo para aplicar el tratamiento esterilizante, así como el periodo necesario para evaluar su eficacia.

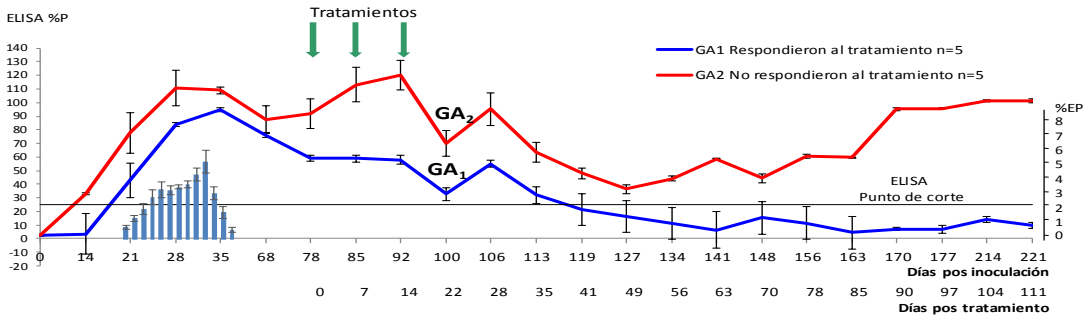
Bibliografía

Molad, *et al*. 2006. Molecular and serological detection of *A. centrale*- and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. Vet. Microbiol. 113:55-62.

Coetzee, *et al*. 2005. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. Vet. Parasitol. 127:61-73.

Roby, *et al*. 1972. Elimination of the carrier state of bovine anaplasmosis with imidocarb. *Am J Vet Res.* 33(10):1931-1933.

Figura 1. Evolución de los anticuerpos (ELISA; %P promedio), contra *Anaplasma marginale* en bovinos infectados y tratados con 3 dosis de 20 mg/kpv de oxitetraciclina LA, con intervalo de 1 semana a los 78 días pos inoculación. Barras: % de eritrocitos parasitados promedio (n=10).



B20- DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *MYCOPLASMA* AISLADOS DE GANADO LECHERO MEDIANTE PCR MÚLTIPLE.

Neder, V.E[1].; Amadío, A.[2]; Calvinho, L[1,3].
[1]Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, INTA. Argentina. [2]Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.[3] Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. neder.veronica@inta.gob.ar

Introducción

Los *Mycoplasma* son bacterias que carecen de pared celular, pertenecen a la clase *Mollicutes*, tienen genomas pequeños y presentan un bajo contenido de GC. Son considerados parásitos en el hombre, animales y plantas. Los *Mycoplasma* causan infecciones óticas, respiratorias, reproductivas y mamarias en bovinos; siendo *Mycoplasma bovis* la especie aislada con mayor frecuencia de infecciones en bovinos en EE.UU. y Europa (Maunsell et al., 2011). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que menos del 25% de los aislamientos obtenidos en Argentina a partir de muestras de ganado lechero corresponden a *M. bovis* (Tirante el al., 2012), habiéndose diagnosticado asimismo otras especies como *M. canadense*, *M. californicum* (Tamiozzo et al., 2014) y *M. leachii* (Neder et al., 2017). Esto determina la necesidad de contar con métodos de laboratorio que permitan caracterizar las especies más frecuentemente aisladas, tanto para la implementación de planes de control como para la realización de estudios epidemiológicos. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar dos técnicas de PCR multiplex para identificar especies de Mycoplasma aisladas de muestras biológicas de ganado bovino.

Materiales y métodos

El estudio se realizó con cepas de Mycoplasma aisladas a partir de muestras de leche de tanque, de cuartos mamarios y órganos de bovinos que fueron remitidas al laboratorio de microbiología del Grupo Salud Animal de la EEA INTA Rafaela entre el año 2009 y 2016. Las cepas (n=41) fueron aisladas a partir de cultivo en medio Hayflick modificado luego de incubación a 37ºC +/- 1ºC en atmosfera de CO_2 al 10% por 7 a 10 días. La extracción del ADN se realizó por calentamiento a 100°C por 10 minutos, se centrifugó 2 min a 10.000 g y se recuperó el sobrenadante. El ADN extraído se utilizó como templado para la realización de una PCR genérica para identificación de Mycoplasma spp., amplificando un fragmento del gen 16-23 S rRNA. Para la identificación a nivel de especie de los aislamientos positivos, a partir de la región conservada 16S-23S rRNA, se desarrollaron 2 multiplex PCR, una para detectar las especies *M. bovis* y *M. canadense* y otra para detectar las especies *M. californicum* y *M. leachii*. Para M. bovis se utilizaron primers previamente descriptos, mientras que para las especies *canadense, californicum* y *leachii.* se diseñaron primers específicos Neder, 2017).Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%

Resultados

En la tabla se muestran las frecuencias de aislamientos obtenidos.

Especie de *Mycoplasma*	Número y porcentaje sobre total de aislados	Origen (número de aislados)
M. bovis	3 (7,32%)	Leche de tanque (2), artritis (1)
M.californicum	6 (14,64%)	Infección mamaria (4), leche de tanque (2)
M. canadense	1 (2,44%)	infección mamaria
M. leachii	31 (75,6%)	Infección mamaria (21), leche de tanque (6), artritis (3), absceso mandibular (1),
Total	41 (100%)	

Discusión

El desarrollo y uso de dos PCR multiplex permitió la identificación a nivel de especie de todos los aislamientos de *Mycoplasma* obtenidos. Este resultado confirma la presencia de estos patógenos en diversas muestras biológicas procedentes
de ganado lechero a través de técnicas moleculares al alcance de laboratorios de complejidad mediana. Además, la metodología de extracción de ADN usada no requiere solventes tóxicos, permitiendo que la técnica sea más segura y económica. Si bien al tratarse de una muestra de conveniencia, no es posible determinar la prevalencia de los patógenos aislados, los resultados confirman hallazgos recientes en nuestro país (Tamiozzo et al., 2012; Neder et al., 2017). El uso de estas técnicas será de utilidad no solamente para conocer las especies que habitualmente están presentes en una región, sino también para el desarrollo de investigaciones sobre el mecanismo de infección y para estudios de epidemiologia molecular de las especies de Mycoplasma aisladas con mayor frecuencia en nuestro país.

Bibliografía

F.P. Maunsell, A.R. Woolums, D. Francoz, R.F. Rosenbusch, D.L. Step, D.J. Wilson, and E.D. Janzen. 2011. Mycoplasma bovis Infections in Cattle. J Vet Intern Med 2011;25:772–783.
Neder, V.E.; Amadío, A.; Calvinho, L. Characterization of Mycoplasma species from dairy cattle in Argentina. Modalidad poster en: 18th WAVLD International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians en Sorrento, Italia, del 7 al 10 de junio 2017.
Tamiozzo, P.J; Estangueta A, Maito J, Tirante L, Pol M, Giraudo J.2014. Detection of Mycoplasma canadense and Mycoplasma californicum in dairy catlle from Argentina. Rev. Arg. Microbiol.46:119-121.
Tirante, L. Neder, V., Maito, J., Gavidia, M., Baumberger, C., Chaves, J., Pol, M., Canavesio, V., Calvinho, L.2013. Mycoplasma mastitis in dairy catlle in Argentina. Proceedings National Mastitis Council 52 Annual Meeting. San Diego, EE.UU

B21- DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN DE CÓLERA AVIAR EN PAVOS MEDIANTE PCR

N. Moiso[1], B. Pelliza[1], V. Gutierrez[1]; Bauman Aino, B[1]; Ruiz, C[1]; Martinez Amado, C[1].
1- Departamento de Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 km 601. Río Cuarto, Córdoba, Argentina. CP 5800
E-mail: nicolasmoiso@gmail.com

Introducción

El Cólera aviar es una enfermedad contagiosa que afecta a las aves domésticas y silvestres. Ocurre frecuentemente en pollos y pavos reproductores criados intensivamente en explotaciones industriales. Generalmente desarrolla cuadros septicémicos con altos índices de morbilidad y mortalidad, también hay un cuadro crónico o leve donde ésta es endémica, con infección localizada en aparatos respiratorio y locomotor. La herramienta más común para el control del cólera aviar es la vacunación, ya sea administrando vacunas inactivadas o vivas atenuadas. El agente etiológico es *Pasteurella multocida* una bacteria gram negativa, no móvil, cocobacilar, aerobia facultativa, no esporulada, fermentadora y oxidasa positiva. Cinco serotipos basados en antígenos capsulares fueron descriptos como A, B, D, E y F. En el presente trabajo se evalúa la factibilidad de clasificar cepas de campo mediante la técnica de PCR, que resulta en una especificidad mayor que las técnicas convencionales bacteriológicas, el objetivo es determinar un predominio del serotipo A, implicado en el Cólera aviar.

Materiales y métodos

El presente trabajo comenzó a realizarse a mediados del 2017 en el Laboratorio de Patología Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto, a partir de muestras provenientes de frigorífico de pavos de la Provincia de Córdoba. Fueron seleccionadas 50 aves al azar, en las instalaciones del frigorífico, se tomaron pulmones e hígados, éstas con presencia de lesiones y otras sin lesiones aparentes. Las lesiones observadas constituían áreas redondas blanquecinas de tamaño entre 0,1 a 0,2 mm, diseminadas por todo el parénquima. Las colonias primarias compatibles con el género *Pasteurella* fueron obtenidas a partir de pulmones e hígados, cultivadas en agar sangre a 37ºC en condiciones de aerofilia. El ADN molde se obtuvo mediante lisis por calor. Como controles positivos y negativos, se utilizó ADN de *P. multocida* ATCC 12945 y agua destilada respectivamente. Las técnicas de PCR se realizaron primero con el fin de identificar especie (amplificando un fragmento del gen KMT) y luego serotipos capsulares. Para ello se utilizaron los cebadores y las condiciones descriptas por Townsend *et al*. (1998) y Townsend *et al*. (2000) respectivamente. Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 % y visualizados en un transiluminador de luz UV en presencia de bromuro de etidio.

Resultados

De las 50 muestras procesadas, un total de 20 cepas sospechosas fueron aisladas en agar sangre, de las cuales 18 fueron positivas a la PCR específica de especie, y de estas, todas fueron positivas al serotipo capsular A.

Discusión

En el presente estudio se ha evidenciado en los resultados obtenidos, un predominio notorio de *Pasteurella multocida* serotipo capsular A. Esto se corresponde con el serotipo causante del Cólera aviar. Esto indica que existe una circulación del agente en producciones poco frecuentes como es la cría de pavos. En conclusión, el procedimiento realizado resultó eficiente para la detección de especie y serotipo de *P. multocida*. Este método de identificación por PCR ofrece mayor especificidad y rapidez de manera directa a partir de cultivos bacterianos. El objetivo fue ampliamente cumplido, ya que todas las cepas provenientes de cultivo de órganos de pavo, clasificadas como *P. multocida* resultaron ser serotipo capsular A.

Bibliografía

1- TOWNSEND, K. M., A. J. FROST, C. W. LEE, J. M. PAPADIMITRIOU, AND H. J. DAWKINS. (1998). Development of PCR assays for species-and type-specific identification of Pasteurella multocida isolates. J. Clin. Microbiol. 36:1096–1100.
2- TOWNSEND, K. M., BOYCE, J. D., CHUNG, J. Y., FROST, A. J. AND ADLER, B. (2001). Genetic organization of Pasteurella multocida cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. J. Clin. Microbiol. 39: 924–929.
3- MOISO, N., TAMIOZZO, P., PELLIZA, B. (2015) Identificación y caracterización de aislamientos de *Pasteurella multocida* obtenidos a partir de muestras pulmonares en bovinos, cerdos y aves.
4- HARPER, M., BOYCE, J.D., ADLER, B. (2006). Pasteurella multocida pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiol. Lett. 265: 1–10.

B22- IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CAMPYLOBACTER JEJUNI Y CAMPYLOBACTER COLI DE CONTENIDO CECAL EN AVES DOMÉSTICAS

V. Gutierrez[1]; N. Moiso[1]; B. Pelliza[1]; B. Bauman Aino[1]; C. Ruiz[1]; C. Martinez Amado[1].
1. Departamento de Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, CP 5800 E-mail: nicolasmoiso@gmail.com

Introducción

En los últimos años la avicultura ha mostrado, a nivel mundial y más específicamente en la República Argentina, un importante incremento y desarrollo. Pese al constante crecimiento del sector no se ha logrado la adecuada sanidad y bioseguridad en los establecimientos, esto determina riesgos para la seguridad alimentaria, especialmente de patógenos bacterianos zoonóticos. Dentro de los peligros microbiológicos más comúnmente implicados en brotes de ETA, destacan las cepas de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* termofílicos. Aunque existen numerosas vías de transmisión posibles, se ha identificado la carne de pollo como una de las vías alimentarias más importantes para estos organismos. En la Argentina y más específicamente en Córdoba, son escasos los trabajos sobre detección y circulación de Campylobacter en la cadena avícola. Es por eso que este trabajo tiene como objetivo la evaluación de diferentes medios diagnósticos para la detección de Campylobacter.

Materiales y métodos

Las muestras se obtuvieron de granjas del sur de Córdoba. Para la detección del agente se muestrearon pollos parrilleros, gallinas ponedoras, aves ornamentales y escarabajo de cama (Alphitobius diaperinus). Un total de 30 muestras fueron procesadas, 27 muestras de contenido cecal y 3 pooles de escarabajos de cama (de diferentes granjas), de las cuales 12 pertenecían a gallinas ponedoras, 11 muestras de pollos parrilleros, 2 de pollitos bebés, 1 de faisán dorado y 1 de pavo real. El procedimiento se realizó en el Laboratorio del Departamento de Patología Animal de la U.N.R.C. Para el cultivo de Campylobacter se utilizó como muestra contenido cecal de las aves, y de escarabajos de cama se realizó un macerado de los mismos. Todas las muestras fueron cultivadas en diferentes medios de cultivo para comparar resultados y evaluar efectividad de aislamieto. Los medios utilizados fueron Agar Skirrow modificado, Agar Brucella, Müeller – Hinton, mCCDA y Agar Sangre. En todos los medios se depositó la muestra sobre filtro de celulosa de 0,22 µm, se lo dejó difundir durante 15 minutos a 37º, luego se retiró el filtro y se procedió al agotamiento en cada placa. Luego los cultivos fueron sometidos a condiciones de microaerofilia, probados con tres distintos métodos: 1- Jarra de microaerofilia con vela. 2- Jarra de microaerofilia con sobres Campy Gen de Oxoid. 3- Jarra de microaerofilia con mezcla de ácido cítrico y bicarbonato de sodio. Los aislamientos primarios sospechosos fueron procesados de la siguiente forma: 1- Observación en fresco. 2- Coloraciones de Gram y otra de Fucsina. La primera para observar motilidad y la segunda morfología. Luego de observar compatibilidad con el género Campylobacter, las colonias sospechosas fueron sometidas a la Reacción en Cadena de la Polimerasa específica de género y especies, bajo las condiciones descriptas por Linton (1996) (amplificando el gen 16S RNA específica del género Campylobacter) y Vandamme (2007), (amplificando un fragmento del gen jej y col para jejuni y coli respectivemnete). El ADN molde se obtuvo mediante lisis por calor. Como controles positivos y negativos, se utilizaron ADN de *Campylobacter jejuni* y *coli* proporcionados por el ANLIS "Carlos G. Malbrán" y agua destilada respectivamente. Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV.

.

Resultados

De la totalidad de muestras procesadas (30), sólo en 6, correspondientes a gallinas ponedoras, hubo desarrollo de Campylobacter en los medios mCCDA y Skirrow modificado, en todas las atmósferas de microaerofilia utilizadas, como cultivo primario. En los repiques para conservación y antibiograma, hubo crecimiento en todos los medios y atmósferas. Los 6 cultivos compatibles con Campylobacter, fueron sometidos a la Reacción en Cadena de la Polimerasa, específica de género, resultando positivos a Campylobacter sp. Luego, a los mismos, se les realizó la PCR para especies, obteniéndose como resultados, todos Campylobacter coli.

Discusión

En el reciente trabajo, se ha constatado un predominio de aislamientos de Campylobacter coli de contenido cecal de gallinas ponedoras. Es sabido que la prevalencia de Campylobacter jejuni es mayor, por lo que se sumarán nuevos muestreos para tratar de evidenciarlo. Está demostrada la importancia de Alphitobius diaperinus en la diseminación, aunque aún no se ha logrado aislar. No se han encontrado grandes dificultados en los aislamientos en diferentes medios de cultivo**,** por lo que se podría optar por realizar los cultivos primarios en medios, más económicos, sin aditivos de antibióticos y con la utilización de filtros de celulosa, observándose los mismos resultados que con medios selectivos. Hemos encontrado diferencias en la atmósfera de microaerofilia utilizada, con la Jarra de microaerofilia con vela, observamos que el crecimiento era más lento con respecto a la utilización de sobres Campy Gen de Oxoid, y con la mezcla de Citrato y Bicarbonato de sodio.

Bibliografía

1-Rapid identification by PCR of the genus Campylobacter and of five Campylobacter species enteropathogenic for man and animals. Linton, D., Owen, RJ., Stanley, J. ELSEVIER, Res Microbiol. 1996 Nov-Dec;147(9):707-18.
2-Campylobacter hyoilei Alderton el al. 1995 and Campylobacter coli Veron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. Vandamme, P., Van Doorn L.J., al Rashid S.T., Quint W.G., Van der Plas, J., Chan, V.L., On, S.L., 1997. Int. J. Syst. Bacteriol 47 1055-1060

B23- COLECCIÓN DE CEPAS DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA, GRUPO SANIDAD ANIMAL, EEA INTA BALCARCE

V. Salazar[1;2]; M.A. Fiorentino[1;2]; K. Cirone[1;2]; A. Velilla[1]; J. Huberman[1]; B. Vasini Rosell[2,3]; F. Bresky[2,4]; R. Malena[1]; C. Morsella[1]; R. Gonzalez[1]; A. Mendez[1]; L. Mendez[1]; J. Lomónaco[1]; P. Nievas[1]; F. Paolicchi[1;2]
1. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Balcarce. Laboratorio de Bacteriología, Grupo de Sanidad Animal.
2. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata.
3. Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, CONICET.
4. Comisión de Investigaciones Científicas, CIC.
Email: *paolicchi.fernando@inta.gob.ar*

Introducción

El principal objetivo de las colecciones es conservar los microorganismos *ex situ* manteniéndolos puros y con estabilidad genética, morfológica o fisiológica de tal manera que puedan conservar sus características originales[1]. Con el desarrollo de la biotecnología y la bioingeniería, el mantenimiento de esta estabilidad y viabilidad adquiere mayor importancia.

El creciente reconocimiento de la importancia de las colecciones microbianas como material de referencia y la continua demanda de los servicios que ofrecen, ha generado interés en incentivar la creación de nuevas colecciones y mejorar los estándares de calidad con el fin de adquirir materiales confiables y auténticos para la comunidad científica.

El Laboratorio de Bacteriología del Grupo de Sanidad Animal de la EEA INTA Balcarce, cuenta con una importante colección de cepas bacterianas de importancia para la región, en relación a los principales temas de Sanidad Animal. La misma está incluída en el Programa Nacional de INTA Red de Recursos Genéticos (REDGEN) y en la Federación Latinoamericana de Colecciones Cultivos (FELACC).

Las cepas provienen de casos que ingresaron al Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado y también de diversos trabajos de investigación y ensayos a campo que se han realizado en el Laboratorio.

El objetivo de este trabajo es informar sobre el estado de la colección de cepas del Laboratorio de Bacteriología de la EEA INTA Balcarce y destacar la importancia del mantenimiento de las colecciones microbianas.

Materiales y métodos

Se realizó una actualización y recopilación de la información contenida en la base de datos de la colección de cepas del Laboratorio de Bacteriología. A partir de dicha información se clasificaron los aislamientos según su género, distribución por especie animal y origen geográfico.

El procedimiento para la obtención y conservación de las cepas consistió en la realización del cultivo a partir de las muestras remitidas de órganos, huesos, fluidos (leche, semen, mucus cérvico-vaginal, esmegma prepucial, etc.), materia fecal, alimentos (ensilados, sustitutos, etc.) y efluentes, el aislamiento, caracterización y tipificación mediante bioquímicas clásicas de las cepas bacterianas de interés veterinario. Una vez identificadas y comprobada su pureza, las cepas se conservaron en nitrógeno líquido, con réplicas en freezer a -80°C cuando se requirieron lotes de trabajo y en los casos donde las características del microorganismo lo permitieron también se conservaron liofilizadas. Los datos de cada cepa son volcados en una base de datos digital, con copia en papel, donde se registran el número o código de identificación, ubicación del vial o ampolla, número de protocolo, origen de la muestra, datos geográficos, epidemiológicos y del establecimiento o rodeo/majada de origen, así como cualquier otra información que se considere relevante.

Resultados

La colección del Laboratorio, iniciada en 1977, al día de hoy cuenta con 2.585 aislamientos pertenecientes a 38 géneros bacterianos de interés en sanidad animal e inocuidad agroalimentaria.

Los aislamientos en su mayoría provienen de bovinos, seguido de aves y ovinos. El resto corresponde a otras especies como la caprina, porcina, equina, especies no tradicionales y muestras de alimentos y efluentes de producciones ganaderas (gráfico 1).

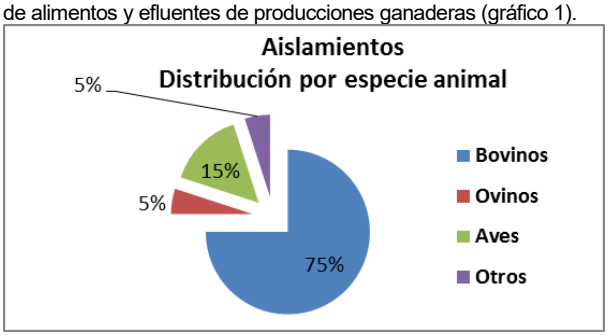


Gráfico 1. Distribución de los aislamientos bacterianos según especie animal. Laboratorio de Bacteriología, Grupo Sanidad Animal, EEA INTA Balcarce.

Muchos de los géneros conservados constituyen importantes líneas de trabajo del laboratorio y representan subcolecciones de gran relevancia. Tal es el caso de géneros como *Mycobacterium* spp. (*M. bovis, M. paratuberculosis,* MNT) con gran cantidad de cepas tipificadas por biología molecular (PCR, Spoligotyping y MIRU-VNTR), *Campylobacter* spp. (*C. fetus*, *C. fetus venerealis*, *C. jejuni*) con cepas tipificadas y genomas completamente secuenciados, *Salmonella* spp., cuyas cepas son serotipificadas, *Brucella* spp., *Moraxella* spp., *Pasteurella* spp., *Histophilus* spp., *Avibacterium* spp, *Clostridium spp, Listeria* spp, *Escherichia coli* y sus diversos patotipos, entre otros géneros de importancia en veterinaria.

Discusión y conclusiones

La preservación bacteriana es fundamental no solo para el resguardo de una cepa con potencial biotecnológico, sino también para el estudio futuro en la búsqueda de nuevas funciones de los genes de un microorganismo de interés[2].

La colección de cepas bacterianas de importancia en Sanidad Animal conservadas en el Laboratorio, ha permitido realizar estudios sobre relevancia epidemiológica, identificando la distribución de los microorganismos y la evolución de las enfermedades infecciosas en especies animales de importancia económica para la región. Siendo de fundamental importancia para llevar adelante trabajos de investigación, producción de antígenos para diagnóstico, antisueros específicos, vacunas experimentales y puesta a punto de técnicas de tipificación molecular, así como caracterización de genes de virulencia o de resistencia y estandarización de pruebas de diagnóstico de laboratorio o en ensayos de desafío experimental en modelos animales para estudios de inmunogenicidad de productos veterinarios. La colección puede representar una diversidad limitada, pero son el reservorio de cepas de referencia para análisis comparativos o diagnósticos y de cepas para estudios básicos o aplicados en la generación de innovaciones biotecnológicas y desarrollos agroindustriales.

Bibliografía

1. Gonzáles D., Jiménez J. 2013. Colecciones microbianas: Importancia, establecimiento y regulación. Hechos Microbiol. 4(1); 23-33.
2. Morales-García Y., Duque E., et al. 2010. Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. BioTecnología, 14 (2); 11-29.

B24- GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* AISLADAS EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA

V. Salazar[1;2]; C. Morsella[1]; ML. Mendez[1]; K. Cirone[1;2]; M. Zumárraga[3]; J. Marfil[3]; F. Paolicchi[1;2]
1. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Balcarce. Laboratorio de Bacteriología, Grupo de Sanidad Animal.
2. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata.
3. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Instituto de Biotecnología, CICVyA.
E-mail: paolicchi.fernando@inta.gob.ar

Introducción

Las colecciones de microorganismos son esenciales para el desarrollo de tecnologías con aplicación en la producción agropecuaria, agroindustrial y sanidad animal. El objetivo primario para la concepción de una colección de cultivos microbianos es mantener las cepas en un estado viable sin cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos. Con el desarrollo de la biotecnología y la bioingeniería, el mantenimiento de la estabilidad y viabilidad adquiere mayor importancia para estudios moleculares y del genoma. Por lo tanto, contar con cepas genotipificadas agrega valor a las colecciones y aporta herramientas para la mejora y el desarrollo de nuevas tecnologías diagnósticas.

El Laboratorio de Bacteriología del Grupo de Sanidad Animal de la EEA INTA Balcarce cuenta con una importante colección de cepas de *Mycobacterium bovis*, agente etiológico de la Tuberculosis Bovina (TB), enfermedad con implicancias en la Salud Pública y que afecta la productividad y el comercio[1]. Las cepas son conservadas en nitrógeno líquido y provienen de casos de TB que ingresan al Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado pero también corresponden a aislamientos en trabajos de investigación. El objetivo de este trabajo fue genotipificar mediante la técnica de *Spoligotyping* cepas de *M. bovis*, aisladas en la provincia de Buenos Aires, conservadas en nitrógeno líquido y que forman parte de la colección de micobacterias del cepario del Laboratorio.

Materiales y métodos

Se seleccionaron 50 cepas aisladas de: a) bovinos necropsiados a campo o en sala y b) bovinos faenados en plantas frigoríficas entre los años 2010 y 2017 de la Provincia de Buenos Aires. Las muestras fueron sometidas a un proceso de descontaminación siguiendo el método Petroff y luego incubadas en medios de cultivo específicos tales como Stonebrink y Löwestein-Jensen. Las colonias características de la especie fueron sometidas a tinción de Ziehl Neelsen y extracción de ADN para llevar a cabo la PCR IS*6110*, que está presente en miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Para genotipificar los aislamientos se llevó a cabo la técnica de *Spoligotyping* según Kamerbeek et al.[2]. Los patrones obtenidos se ingresaron y compararon con los de la base de datos www.mbovis.org[3].

Resultados

Del total de cepas seleccionadas se diferenciaron 12 espoligotipos diferentes (gráfico 1). Los más frecuentes fueron el SB0140 (42%), seguido por el SB0145 (20%) y el SB2504 (6%). Este último constituyó un hallazgo novedoso, ya que a la fecha de ingreso no se encontraba descripto en la base de datos internacional, siendo el primer reporte de este espoligotipo.

Los aislamientos que presentaron este nuevo espoligotipo provenían de un rodeo lechero ubicado en el partido de Trenque Lauquen. Todos los animales sacrificados presentaban lesiones macroscópicas compatibles con TB y las improntas realizadas directamente de ganglios resultaron positivas a la tinción de Ziehl Neelsen.

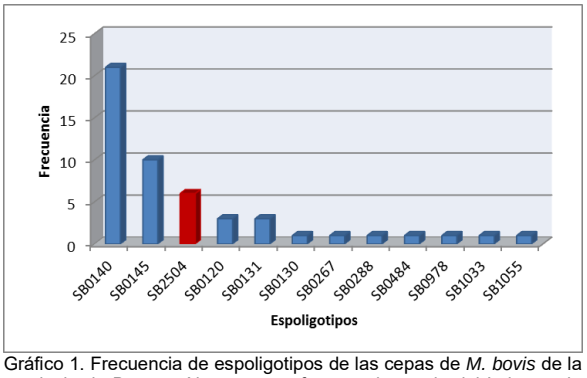


Gráfico 1. Frecuencia de espoligotipos de las cepas de *M. bovis* de la provincia de Buenos Aires que conforman el cepario del Laboratorio de Bacteriología de la EEA INTA Balcarce. La barra de color rojo indica la frecuencia del nuevo patrón internacional.

Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos están en concordancia con estudios previos en los que se indica que el espoligotipo SB0140 es el más frecuentemente detectado en los aislamientos estudiados de Argentina, tanto en bovinos como en otros animales[4,5], siendo además uno de los espoligotipos con mayor frecuencia de aislamientos en el mundo[1].

Respecto al espoligotipo SB2504, serán necesarios otros estudios para determinar si se trata de cepas con distinto nivel de virulencia o patogenicidad y quizás con implicancias aún mayores en Salud Pública.

La genotipificación de las cepas de *M. bovis* que integran la colección del Laboratorio genera información que podría ser de utilidad en estudios de epidemiología molecular y en la mejora de los programas de control y erradicación de la TB.

Bibliografía

1. Andrievskaia O., Turcotte C., et al. (2018). Genotypes of *Mycobacterium bovis* strains isolated from domestic animals and wildlife in Canada in 1985–2015. Veterinary Microbiology, 214, 44–50.
2. Kamerbeek J., Schouls L., et al. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. Journal of Clinical Microbiology, 35 (4), 907-914.
3. Smith, N. H. and P. Upton. (2012). Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis complex*; www.Mbovis.org. Infection, Genetics and Evolution, 12 (4), 873-876.
4. Garbaccio S., Macias A., et al. (2014). Association between spoligotype-VNTR types and virulence of *Mycobacterium bovis* in cattle. Virulence 5(2), 297-302.
5. Zumárraga M., Arriaga C., et al. (2013). Understanding the relationship between Mycobacterium bovis spoligotypes from cattle in Latin American Countries. Research in Veterinary Science, 94 (1), 9-21.

B25- PARATUBERCULOSIS BOVINA: CONFIRMACIÓN DE UN CASO DE INFECCIÓN CONGÉNITA MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS MOLECULARES

B. Vasini Rosell[1;3], B. Lagleyze[2], C. Morsella[3], L. Mendez[3]; A. Gioffré[4], F. Paolicchi[3].
1. CONICET 2. Actividad Privada. 3. Grupo de Sanidad Animal, Unidad Integrada Balcarce INTA-UNMDP 4. Instituto de Biotecnología INTA Castelar
paolicchi.fernando@inta.gob.ar

Introducción

La paratuberculosis bovina (PTBC) es una enfermedad entérica crónica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) cuya principal vía de transmisión es la fecal-oral. Sin embargo, varios estudios demuestran la transmisión prenatal por vía congénita como una fuente de contagio al feto por nacer. El objetivo de este trabajo fue confirmar un presunto caso de infección congénita ocurrido en Argentina mediante el uso de la técnica de MLVA aplicada en cepas de MAP aisladas de tejidos fetales y tejidos de la madre.

Materiales y métodos

En un establecimiento de cría bovina de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, se identificó una vaca preñada con una gestación aproximada de 6 meses, con signos clínicos de PTBC (diarrea, pérdida de peso y edema submandibular). Se tomaron muestras de sangre y materia fecal y a continuación se realizó la eutanasia[1] y se tomaron muestras estériles de válvula ileocecal, linfonodos mesentéricos e intestino. El útero fue trasportado al laboratorio en forma aséptica y bajo medidas de bioseguridad. Una vez abierto, se extrajeron muestras del feto: linfonodos y fluidos corporales.

A partir de las muestras recolectadas se realizaron cortes histológicos y tinción de Hematoxilina-Eosina para observación al microscopio y cultivo de los órganos y materia fecal en medio Herrold suplementado con yema de huevo, piruvato y micobactina (HMP). El suero obtenido a partir de las muestras de sangre se utilizó para realizar un ELISAi *in house* en busca de anticuerpos específicos contra MAP. Este test de iELISA se elabora con el antígeno protoplasmático de paratuberculosis (PPA- Allied Monitor – USA) que establece que un valor de DO_{405} entre 0 y 1.4 corresponde a un animal negativo para PTBC y un valor de DO_{405} mayor a 2 corresponde a un animal positivo. Finalmente, a partir de las colonias obtenidas en Herrold, se realizó la extracción de ADN utilizando el kit Quiagen DNeasy® y luego las muestras fueron confirmadas como MAP a partir de la PCR IS*900* y la técnica de MLVA[2] (Multiple loci variable analysis) para establecer el genotipo. Para ello se utilizaron primers específicos para 8 loci descriptos anteriormente y marcadores de peso molecular de 50pb (Promega, USA) y 100bp (INBIO, Argentina) dependiendo del tamaño del fragmento esperado. Los resultados fueron comparados con la base de datos del Instituto de Investigación Agropecuaria de Francia (INRA) donde se estable una nomenclatura especifica para cada patrón llamada INMV (INRA Nouzilly MIRU VNTR) http://mac-inmv.tours.inra.fr/.

Las muestras obtenidas de la madre fueron identificadas como 907-K32 y las del feto 907-K37.

Resultados

Los resultados histológicos para 907-K32 arrojaron un diagnóstico de linfadenitis y enteritis granulomatosas a partir de la presencia de células gigantes e infiltrado mononuclear inflamatorio en el intestino delgado y linfonodo mesentérico (LM).

El análisis de ELISA fue sospechoso (valor de DO entre 1.5 Y 2) tanto para las muestras 907-K32 y 907-K37. Sin embargo, en el cultivo en medio HMP se aislaron colonias a partir de las muestras de intestino y LM de 907-K32 y LM DE 907-K37. Todas las colonias fueron confirmadas como MAP mediante PCR IS*900*.

Las muestras finalmente fueron analizadas mediante la técnica de MLVA resultando todas las colonias aisladas desde tejidos fetales y de la madre pertenecen al mismo genotipo identificado como INMV 1.

Discusión y conclusiones

Numerosos estudios han demostrado que entre el 20 y el 40% de los terneros nacidos de vacas con infeccion clínica de PTBC ya se encuentran infectados in utero[3,4]. Este hallazgo fue el primer reporte de aislamiento de MAP en fetos bovinos de vacas con PTBC clínica de la Argentina y el uso de técnicas de tipificación moderna, como el MLVA, permitieron confirmar la relación genotípica entre la bacteria aislada desde la madre y desde su feto, favoreciendo así al correcto diagnóstico. En este estudio también se observó que el ELISA aplicado en vacas preñadas con infeccion clínica avanzada es una prueba moderadamente predictiva, probablemente debido a la inmunodepresión que provoca la PTBC. Se demuestra de esta manera la posibilidad de transmisión vertical y posterior nacimiento de terneros infectados que mantienen la enfermedad en los rodeos bovinos.

Bibliografía

1.Shearer, J. K. (2008). Effective Euthanasia of Cattle under Field Conditions, 41, 92–96.

2.Thibault, V. C., Grayon, M., Boschiroli,… Biet, F. (2007). New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: Comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. Journal of Clinical Microbiology, 45(8), 2404–2410. https://doi.org/10.1128/JCM.00476-07

3.Belo-Reis, A. S., Salvarani, F. M., Brito,… Barbosa, J. D. (2016). Intrauterine Infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in buffalo (Bubalus bubalis). J Vet Sci Med Diagn, 5(1), 2–6.

4.Whittington RJ1, Windsor PA Vet J. 2009 Jan;179(1):60-9. Epub 2007 Oct 24. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis.

B26- DETECCION DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* MEDIANTE PCR Y ELISA EN CERDOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

MX. Cuerda [1,2]; MA. Colombatti Olivier[1,2]; G. Kissam[1]; L. Vagnoni.[1]; MI. Romano[1,2]; S. Barandiarán[2,3]; MP. Santangelo[1,2].
1.Instituto de Biotecnología, CICVyA INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina
2.CONICET, Godoy Cruz 2290 (C1425FQB) CABA, Argentina
3.Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Cs. Veterinarias (UBA), Buenos Aires, Argentina
E-mail: cuerda.maria@inta.gob.ar

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico producida por bacterias del género *Mycobacterium*. En el cerdo es producida principalmente por *M. bovis*, pudiendo también ser producida por micobacterias del complejo avium (MAC), pudiendo existir co-infección. La principal vía de transmisión es la oral por ser alimentados con productos lácteos no pasteurizados o desechos de mataderos no sometidos a esterilización. Actualmente, el diagnóstico utilizado para la TB porcina en el animal en pie es la intradermorreacción, pero resulta en considerables falsos positivos y negativos en las piaras (SENASA- Res 145/09). De esta manera, la observación directa de lesiones compatibles con tuberculosis (LCT) en las plantas frigoríficas y su aislamiento bacteriológico, constituyen el diagnóstico de certeza para esta enfermedad. El diagnóstico de la TB porcina y su control son relevantes, ya que los animales enfermos son fuente de infección para otros animales de producción y silvestres, así como también para el hombre, por tratarse de una zoonosis

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la utilidad de PCR y ELISA para detectar *M. bovis* en cerdos experimentalmente infectados.

Materiales y métodos

Se trabajó con 10 lechones *Sus scrofa doméstica*, raza Landrance, provenientes de un criadero libre de TB. Los mismos se mantuvieron en adaptación y observación, y durante 2 meses se tomaron muestras de sangre e hisopados retrofaríngeos (HR) para controlar la negatividad de la enfermedad. A los 3 meses de edad, los cerdos se infectaron vía oral, con una cepa local virulenta de *M. bovis*, 5 ml de una dosis 10^5 UFC(Beltrán-Beck2014). Post-infección se tomaron muestras a los 2 meses (2mpi) y a los 4mpi. Para la toma de muestras, los animales fueron sujetados con lazo rígido. Se utilizó un abreboca para realizar el hisopado oral profundo con hisopos de 40cm. Las muestras de sangre fueron tomadas de vena cava y yugular, con agujas 18G 2´´ y jeringas de 10 ml. A partir de los HR, se procedió a la extracción de ADN total utilizando un protocolo con fenol/cloroformo/isoamílico (Zumárraga 2001). Como control positivo de la extracción (presencia de ADN en la muestra) se realizó una PCR utilizando primers de β-actina porcina, luego se procedió a realizar la PCR utilizando primers para la secuencia de inserción *IS6110* y el gen *RV2807*, para la identificación de *M. bovis*. A partir de la sangre, se procedió a la separación del suero por centrifugación, y se estudió la respuesta serológica de la enfermedad mediante la técnica de ELISA. Se utilizó como antígeno un extracto celular de *M. bovis* AN5 absorbido en placas de ELISA Nunc MaxiSorp de 96 pocillos. Los sueros se utilizaron en una dilución 1/200, sembrado por duplicado junto a los controles positivos y negativos, y como sistema de revelado se utilizó anti-IgG porcina conjugado a HRP (Sigma®) con ABTS. Se realizó la lectura de la densidad óptica a λ=405nm. La interpretación de los resultados se realizó en base al criterio utilizado por un kit comercial de ELISA para TB en cerdos (KIT ELISA-VK). Todos los animales fueron sacrificados a los 4mpi, y se tomaron muestras de linfonódulos y órganos para realizar score macroscópico de lesiones en base a la presencia de LCT. El ensayo se realizó en los boxes de Bioseguridad del CICVyA-INTA Castelar, cumpliendo con las normas y procedimientos establecidos por los responsables del sector y bajo las normas del CICUAE (Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación)

Resultados

Todas las muestras de HR tomados previo a la infección fueron negativas a la PCR IS*6110*, de acuerdo con lo esperado. A los 2mpi no se detectó ADN de micobacterias por PCR en ninguno de los 10 animales evaluados. A los 4mpi, solo un animal fue positivo a la PCR *IS6110*. En todos los tiempos se confirmó la presencia de ADN total mediante PCR con los primers para β-actina porcina. Por la técnica de ELISA, ningún animal resulto positivo previo a la infección. Post-infección 3/10 animales resultaron positivos a los 2 y 4mpi comparables a los valores de OD de los controles positivos. Los resultados se contrastaron con la presencia de LCT durante la necropsia. En base a estos resultados se realizó un ranking de score macroscópico.

Discusión y conclusiones

Mediante la técnica de PCR realizada a partir de las muestras de HR, pudimos detectar *M. bovis* sólo en un animal infectado a los 4mpi. Interesantemente, este animal fue el que presentó mayor valor de score macroscópico de lesiones totales y en linfonódulos de cabeza, con diseminación bacteriana. Así mismo, el ELISA revelo alto título de anticuerpos en suero. A partir de estos resultados podemos concluir que la carga bacteriana a nivel oral no fue suficientemente alta como para ser detectada por PCR a partir de las muestras obtenidas. Tampoco podemos descartar que se deba al método de extracción de ADN utilizado. Por ninguno de los dos métodos pudimos detectar un alto número de animales infectados. Esto podría deberse a una baja sensibilidad de ambos métodos o a que no transcurrió el tiempo suficiente para que aumente la carga bacteriana y haya mayor diseminación y posibilidad de detección del bacilo circulante por PCR en la cavidad oral. o detección de anticuerpos circulantes por ELISA.

Bibliografía

Beltran-Beck B, de la Fuente J, Garrido JM, Aranaz A, Sevilla I, et al. (2014) Oral Vaccination with Heat Inactivated Mycobacterium bovis Activates the Complement System to Protect against Tuberculosis. PLoS ONE 9(5): e98048. doi: 10.1371/journal.pone.0098048

Zumárraga M.J., Paolicchi F., Garbaccio S., Gioffré A. y Cataldi A. Aplicación de la PCR en la detección de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejido de terneros. Veterinaria Argentina (2001), Vol.XVIII Nº179: 669-677.

Manual para veterinarios privados acreditados por SENASA. TB ELISA-VK *RD-MAGRAMA SKU: PMBE Product Categories: ELISA, Fabricante, Porcino, Vacunek Product Page: http://vacunek.com/shop/manufacturer/vacunek/tb-elisa-vk/

B27- PRIMER AISLAMIENTO DE *MICOBACTERIUM AVIUM* EN UN PERRO MESTIZO EN LA ARGENTINA

A. L. Karpiuk[1], L. Dominguez[1]., M.X, Cuerda[3]., S.Barandiaran [2y 4],
1-Veterinaria clínica, Instituto de Zoonosis L. Pasteur, GCABA.
2-Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Vetrinarias, Catedra de Enfermedades Infecciosas
3- Instituto de Biotecnología, CICVyA – INTA, Hurlingham, Buenos Aires
4- CONICET, Universidad de Buenos Aires
E-mail: cuerda.maria@inta.gob.ar

Introducción

La tuberulosis en animales de compañía es una patología poco común y generalmente está asociada a escenarios epidemiológicos propicios para la transmisión del agente. Sin embargo existen reportes esporádicos que describen casos con signos inespecíficos que a la necropsia revelan inflamación granulomatosa en diversos órganos incluyendo una linfoadenopatia generalizada Las micobacterias relacionadas a esta patología son las pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y las que integran el complejo *Mycobacterium avium* (MAC). La presencia de enfermedad asociada a estas últimas micobacterias en perros, está altamente vinculada a ciertas razas caninas. El diagnóstico de la enfermedad en perros y gatos no es sencillo. En las primeras fases puede cursar de manera asintomática, incluso en animales con lesiones importantes. Cuando presentan signos clínicos son normalmente inespecíficos así también como los cambios hematológicos y de bioquímica. Se sospecha de TB en los animales con signología compatible con enfermedad crónica, desnutridos, con neumopatías, adenopatías, úlceras cutáneas, abscesos y granulomas en diferentes órganos. Por lo tanto el correcto diagnóstico se basa en historia compatible, Histopatología de biopsia del tejido afectado o necropciado, la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) con la coloración de Ziehl Neelsen (ZN) y la confirmación del agente etiológico mediante cultivo bacteriológico y molecular. Se deriva al Instituto de Zoonosis L. Pasteur un canino mestizo hembra de 7 años con un resultado de citología de punción de linfonódulo positivo a coloración Ziehl Neelsen (AAR). El motivo inicial de consulta fue por claudicación en uno de sus miembros, pero durante el examen objetivo general se evidenció linfoadenomegalia superficial generalizada.
El objetivo del trabajo fue confirmar la presencia de micobacterias en el perro mestizo a partir de las muestras tomadas y elaborar una terapéutica efectiva para la evolución del paciente.

Materiales y métodos

La examinación del paciente consistió en la revisación clínica y estudios complementarios, que incluyeron radiografía de tórax y abdomen, ecografía de abdomen, hemograma, bioquímica sanguínea, hisopado rectal para coloración Ziehl Neelsen (AAR), punción de linfonódulo para citología y cultivo y hemocultivo, sembrados en medios Löwenstein-Jensen y Stonebrink. Los cultivos fueron observados semanalmente durante dos meses. Cuando se observó desarrollo bacteriano se remitió muestra al Instituto. Malbran para tipificación final por PCR.

Resultados

Durante la revisación clínica se evidencia linfoadenomegalia moderada generalizada, soplo de intensidad 2-3/6, normotermia y por palpación abdominal masa en mesogastrio compatible con hepato o esplenomegalia. Como hallazgos relevantes de la ecografía abdominal se mencionan bazo con marcado aumento de tamaño y ecoestructura en panal de abeja, sugerente de linfoma. Hígado de tamaño aumentado, bordes algo redondeados, aumento de linfonódulos ilíacos medios de ambos lados, mesentéricos, esplénicos y hepáticos, pequeña cantidad de líquido libre y aparenta reacción peritoneal.
La citología de la punción del linfonódulo evidencio células inflamatorias con predominio de macrófagos y en menor proporción neutrófilos, observándose numerosos bacilos intracelulares, positivo a coloración Ziehl Neelsen AAR. En la citología del hisopado rectal se observó alta carga de BAAR. Respecto a los valores sanguíneos, la única alteración que se evidenció fue neutrofilia (25400/mm^3) a expensas de los neutrofilos segmentados (19812/mm^3) y se informa presencia de células inmaduras que corresponden a eritroblastos (3048/mm^3).
Se observó crecimiento en los cultivos realizados en ambos medios y luego se tipificó por PCR identificando a dicho microorganismo como *Mycobacterium avium (M.avium)*.

Tratamiento y evolución

Se comenzó con etambutol 150mg c/ 24hs, ciprofloxacina 90mg c/ 12hs, claritromicina 50mg c/ 12hs. y complejo B como orexígeno. Se observó mejoría del paciente (recuperó el apetito y lo notaron más animado) a la semana de iniciado el tratamiento. A los 50 días de tratamiento, presenta aumento de peso y evidente mejoría general.

Conclusiones

Si bien la tuberculosis por *M. avium* está asociada perros jóvenes y a determinadas razas en particular, como Schnauhzer mini y Basset Hound, no debe descartarse categóricamente en animales de mediana o avanzada edad y en otras razas de perros o mestizos. Más allá de que este agente se encuentra presente en el ambiente, debería considerarse al animal de compañía como una posible fuente adicional de transmisión, sobre todo teniendo en cuenta el hallazgo positivo y con alta carga de bacilos presentes en el hisopado rectal, recobrando importancia si convive con personas inmunocomprometidas, bebes o gerontes.

Bibliografía

Campora L, Corazza M, Zullino C, Ebani VV, Abramo F. 201. Mycobacterium avium subspecies hominissuis disseminated infection in a Basset Hound dog. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Vol 23(5):pp 1083-7.
Barandiaran, S; Martinez Vivot, M; Falzoni, E; Marfil, J; Perez Tort, G; Rovatti, P; Fernandez, M; Iachini, R; Satek, F; Duchenne, A; Zumarraga, M Mycobacterioses in dogs and cats from Buenos Aires, Argentina.. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. J Vet Diagn Investigation, 729-732. doi: 10.1177/1040638717713795. 2017.
O'Toole D, Tharp S, Thomsen BV, Tan E, Payeur JB. Fatal mycobacteriosis with hepatosplenomegaly in a young dog due to Mycobacterium avium. J Vet Diagn Invest. 2005;17:200–4.

B28- DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN CANINOS DEL CONURBANO BONAERENSE Y DE VIRASORO, CORRIENTES

B. Munilla Lacasa[1], A. Ivanessevich[1], T. Tuzinkievicz[2], J. Ascue[2], S. Teyssandier[1], D. Peyrelongue[1], H. Pagliere[1], M. Belliard[1], G. Wilcke[2], S. Elena[3], A. Muñoz[1].
[1]Escuela de Veterinaria, Universidad del Salvador, Pilar, Buenos Aires, [2] Escuela de Veterinaria, Universidad del Salvador, Virasoro,
Corrientes . [3] Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Martínez, Buenos Aires.
bernimunilla@hotmail.com

Introducción

En la actualidad, la brucelosis es una enfermedad que se considera subdiagnosticada y subregistrada, tanto en caninos como en humanos. Esto se da por diversas causas, siendo una de las más importantes las limitaciones que brindan las pruebas diagnósticas utilizadas actualmente para dicha enfermedad y la falta de denuncia por parte de los profesionales de la salud. Si bien en provincia de Buenos Aires existe un procedimiento para denuncia de caninos positivos, esto no existe en otras provincias. En los caninos la aglutinación rápida en portaobjeto (RSAT) se considera una prueba "tamiz", es decir que los resultados positivos obtenidos deben confirmarse como positivos con otras pruebas diagnósticas. Esto se debe a que es una prueba poco específica que además está sujeta a posibles errores del operador y su lectura es subjetiva. Por lo tanto, es de suma importancia utilizar otras técnicas con mayor sensibilidad y especificidad como el test indirecto por inmunoadsorción ligado a enzimas (iELISA). Además, es necesario realizar hemocultivo para obtener un diagnóstico bacteriológico confirmatorio aunque en muchos casos es complicado realizar el cultivo a partir de la sangre y la sensibilidad de esta prueba es muy baja. El objetivo del trabajo es realizar serología para detectar anticuerpos anti-Brucella canis en caninos sin sintomatología que habiten el conurbano bonaerense y en la localidad de Virasoro en la provincia de Corrientes, por la técnica de RSAT y a los sueros positivos realizar la técnica de iELISA. En caso de ser posible a los animales positivos a ambas técnicas se les tomará una nueva muestra para hemocultivo.

Materiales y métodos

Se trata de un estudio observacional de corte transversal, exploratorio, definiendo como área de estudio la localidad de Virasoro, Corrientes y la zona oeste del conurbano bonaersense. Se muestrearon un total de 216 animales en el periodo de tiempo entre mayo del año 2017 y mayo del año 2018, seleccionados aleatoriamente, de diferentes edades, sexos y razas. Se tomaron entre 5 ml y 7 ml de sangre por punción sin anticoagulante, rotulándose la muestra con el número de la historia clínica. Se obtuvo el suero de cada muestra mediante centrifugación a 1200 g por 5 minutos y se conservaron a -20°C hasta su utilización. Todos los individuos muestreados fueron identificados a través de una encuesta que indica datos del canino, así como de su propietario o encargado. Para el diagnóstico serológico de Brucelosis canina se utilizó la prueba RSAT, realizada por dos operadores. Las muestras que resultaron positivas a la prueba mencionada fueron sometidas a iELISA (VETLIS® Brucella iELISA Caninos, Chemtest S.A.). Ocho caninos con serología positiva a RSAT y IELISA fueron muestreados nuevamente, 2 ml de sangre entera fue extraída en forma estéril en frascos para hemocultivo aeróbico y enviados a SENASA. Fueron incubados durante 30 días a 37°C efectuándose pasajes a placas con agar triptosa semanalmente.

Resultados

Se procesaron 216 sueros de ambas regiones y se obtuvieron 36 muestras positivas a RSAT (16,6%), considerando 4 resultados dudosos como positivos. De las 36 muestras, 19 corresponden a hembras (52,7%) y 17 a machos (47,3%). Teniendo en cuenta la edad de los caninos muestreados, se hizo una clasificación en 3 grupos: caninos entre 1-5 años; caninos entre 6-12 años y los individuos de edad desconocida. En el primer grupo etario se encuentra el 44% de las 36 muestras (16 muestras); mientras que en el segundo grupo se encuentra un 28% (10 muestras), al igual que en el ultimo, un 28% (10 muestras). Considerando cada región por separado, en la zona oeste del conurbano bonaerense, de las 149 muestras procesadas resultaron 23 positivas a RSAT (15,4% de positividad). Con respecto a la región de Virasoro, Corrientes; se analizaron 67 muestras, obteniendo 13 muestras positivas (19,4% de positividad). Del total de las 36 muestras positivas a RSAT, todas se sometieron al test iELISA. Esta prueba arrojo resultados de positividad confirmada en 24 muestras (66,7%). Se logró realizar hemocultivo de 8 muestras positivas a RSAT y IELISA, donde se obtuvo 1 muestra positiva a *Brucella canis.*

Discusión y conclusión

A través de los resultados obtenidos, es evidente que hay presencia de caninos positivos en ambas regiones del país, siendo mayor en la localidad de Virasoro, Corrientes. Esto significa un riesgo hacia personas y otros animales. Detectar un animal positivo, en muchas ocasiones servirá para diagnosticar la enfermedad en personas convivientes con el canino portador. No hubo diferencia de importancia entre los dos rangos etarios y entre el sexo de los caninos. Si bien no se logró confirmar la enfermedad en los animales por medio del hemocultivo, obtuvimos animales serológicamente positivos por las dos técnicas. En este trabajo se demuestra que la técnica RSAT es útil a la hora de hacer diagnóstico de brucelosis, pero que es necesario confirmar con otra técnica como la prueba VETLIS® Brucella iELISA Caninos (Chemtest S.A.) que posee alta sensibilidad y especificidad diagnóstica (sensibilidad = 100%, especificidad = 97,8%). Si bien es necesario en todos los casos realizar el hemocultivo para hacer un diagnostico definitivo de la enfermedad, no siempre se logra el aislamiento del agente, por eso resulta importante realizar más de una técnica diagnóstica a la hora de evaluar un animal portador. Resulta importante realizar procedimientos para denuncia de animales positivos a Brucelosis canina en todo el país.

Agradecemos al laboratorio CHEMTEST la provisión del kit VETLIS® Brucella iELISA Caninos .

B29- SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI *LEPTOSPIRA* EN JABALÍES (*SUS SCROFA*) DEL EXTREMO SUR DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

S. Abate[1], M. Winter[1], B. Brihuega[2], D. Birochio[1], A. Antonuci[2], J. Petrakovsky[3], A .Marcos[3]
[1]Centro de Investigaciones y Transferencia Río Negro (CONICET-UNRN), [2]Instituto de Patobiología, INTA Castelar;
[3]Laboratorio de Referencia de la O.I.E. en Leptospirosis-Dirección de Laboratorios y Control Técnico, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).
sabate@unrn.edu.ar

Introducción

La leptospirosis es una de las enfermedades bacterianas más ampliamente distribuidas en el mundo. En el ámbito pecuario genera pérdidas económicas por abortos y mortandad en diversas especies. Para la salud pública es una de las zoonosis bacterianas más difundidas según la OMS. La prevención mediante manejo e inmunoprofilaxis así como el control de fauna silvestre reservorio, son factores esenciales para resguardar la sanidad animal y la salud pública. El jabalí (*Sus scrofa*) es uno de los mamíferos más exitosos y una de las especies exóticas invasoras más dañinas del planeta. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de anticuerpos anti *Leptospira* en jabalíes del extremo sur de la provincia de Buenos Aires.

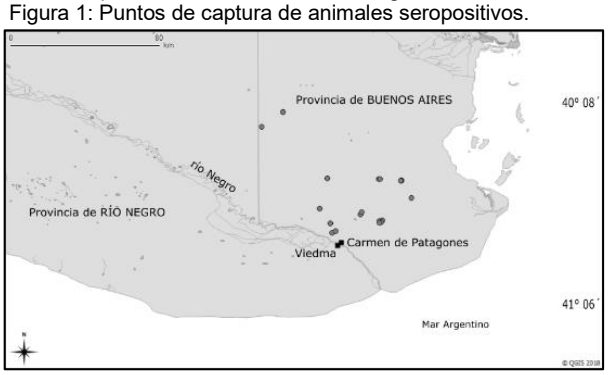
Materiales y métodos

Entre 2014 y 2017 se recolectaron y analizaron mediante la prueba de microaglutinación (MAT) n=109 sueros de jabalíes (*Sus scrofa*) de vida libre. Las muestras de sangre fueron tomadas por cazadores, quienes destinaron los animales para su consumo. No hubo oportunidad de constatar lesiones compatibles con la presencia de *Leptospira*. El área de caza se caracteriza por alternancia entre vegetación autóctona y zonas de producción agropecuaria, donde la caza de jabalí se encuentra permitida y constituye habitual fuente de alimentación entre la población. El MAT se realizó según el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE. Los serovares utilizados en la prueba MAT fueron: Canicola (Serogrupo Canicola), Castellonis (Serogrupo Ballum), Icterohaemorragiae (Serogrupo Icterohaemorragiae), Grippothyphosa (Serogrupo Grippothyphosa), Pomona (Serogrupo Pomona), Pyrogenes (Serogrupo Pyrogenes), Tarassovi (Serogrupo Tarassovi), Wolffi (Serogrupo Sejroe).

Resultados

De los sueros analizados 21 resultaron positivos al serovar Pomona (19,27%) con títulos de 50 (n=1); 100 (n=13); 200 (n=5); 400 (n=1) y 800 (n=1). Un individuo, además, resultó positivo al serovar Wolffi con título 200 (cuyo título frente al serovar Pomona fue de 100). Los puntos de captura de los animales positivos se muestran en la Fig. 1.

Figura 1: Puntos de captura de animales seropositivos.



Discusión y conclusión

En el año 2016 se reportó por primera vez la circulación de leptospiras en 2 de 12 jabalíes de vida libre capturados en el noreste de la Patagonia (Cifuentes, 2016). A partir de ese momento se realiza vigilancia epidemiológica activa anualmente. En 2017 se realizó un reporte preliminar (Abate, 2017). En el presente trabajo se amplían la información incorporando nuevos resultados (Fig. 2) que incluyen por primera vez en la región el hallazgo de jabalíes con serología positiva al serovar Wolffi, y manifiesta un incremento de la seroprevalencia aparente para leptopiras patógenas.

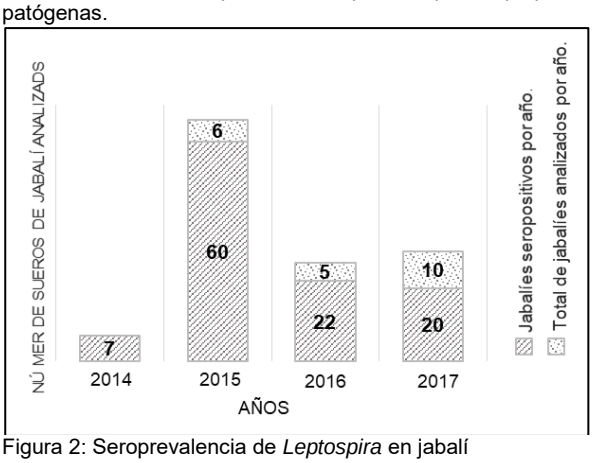


Figura 2: Seroprevalencia de *Leptospira* en jabalí

En Argentina, la población de jabalíes se encuentra completamente establecida y su distribución avanza hacia el sur de la Patagonia, concentrándose alrededor de fuentes de agua disponible, naturales y/o artificiales. En la región de estudio, se manifiesta una expansión de la producción bovina y porcina, principalmente en establecimientos de producción intensiva o semi intensiva. Esta situación facilita el crecimiento de fauna silvestre (jabalíes y roedores) alrededor de comederos y bebederos. La capacidad del jabalí para desplazarse grandes distancias, convivir en grupos de hasta 40 individuos e introducirse en establecimientos pecuarios, alertan sobre su riesgo como fuente de infección para el ganado y las personas que habitan en zonas rurales. Los resultados obtenidos alertan sobre el posible rol del jabalí como reservorio y fuente de infección de enfermedades de interés en la producción pecuaria, indicando la conveniencia de aplicar medidas de bioseguridad para preservar al ganado.

Bibliografía

Abate S, Birochio D, Winter M, Cifuentes S, Antonuci A, Petrakovsky J, Marcos A. 2017. Seroprevalencia de Leptospirosis en jabalí (*Sus scrofa*) de vida libre en un área del noreste patagónico. Libro de resúmenes XVII Jornada Argentina de Microbiología, AAM.

Brihuega B, Samartino L, Romero G, Auteri C, Martinez M, Grune S. 2017. First isolation of Leptospira borgpetersenii from fetuses of wild boars (*Sus scrofa*). Rev Electronic Journal of Biology.

Cifuentes S, Winter M, Birochio D, Antonuci A, Petrakovsky J, Marcos A, Abate S. 2016. Leptospirosis en jabalí (*Sus scrofa*) en una zona de la Patagonia noreste: resultado preliminares. XXIX Jornada Argentina de Mastozoología, San Juan, Argentina.

Petrakovsky, J., Carpinetti, B., Antonuci, A. 2016. Prevalencia Serológica de *Leptospira*spp. en Cerdos Silvestres (*Sus scrofa*) en Bahía de Samborombón, provincia de Buenos Aires, República Argentina, en el Periodo 2013-2015. Salud y Tecnología Veterinaria, 3(1), 23-27.

B30- LEPTOSPIROSIS BOVINA: ANALISIS RETROSPECTIVO DE SEROPREVALENCIA EN HEMBRAS BOVINAS EN EL PERIODO 2005-2017

G. Cantón[1*], I. Alvarez[1], I. Llada[1], E. Morrell[1], E. Odriozola[1], B. Brihuega[2]
[1]INTA, EEA Balcarce. [2]Instituto de Patobiología, INTA, Castelar. *canton.german@inta.gob.ar

Introducción

En Argentina, la seroprevalencia en bovinos a Leptospirosis es alta. La interpretación de resultados serológicos suele ser compleja, sobre todo cuando se analiza una única muestra de suero en bovinos que pueden haberse infectado con el agente muchos meses antes de la ocurrencia del aborto, única expresión clínica de la enfermedad. La respuesta serológica a una infección natural tiene comportamientos variables, dependiendo si se trata de infecciones con serovares de *Leptospira* adaptados al bovino o no. Para infecciones con serovares no adaptados, la expresión clínica suele ser severa ("tormenta de aborto") con una respuesta de anticuerpos marcada, por lo que es esperable títulos de anticuerpos aglutinantes ≥1:800. En cambio, infecciones con serovares adaptados suelen ocurrir a edad temprana, permaneciendo como reservorios, con expresión clínica menos evidente (pérdidas reproductivas endémicas, de baja incidencia), y la respuesta serológica mucho menos evidente, con bajos títulos de anticuerpos o incluso permanecen seronegativos. El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis retrospectivo de los resultados serológicos por microaglutinación en tubo (MAT) de los sueros de vientres bovinos en el periodo 2005-2017.

Materiales y métodos

Se analizaron retrospectivamente los resultados serológicos obtenidos mediante MAT. Se incluyó en el análisis la información respecto a sistema productivo (leche o carne), edad de los animales (vaca o vaquillona), estado reproductivo (vaca gestante, abortada o vacía), la aplicación de vacunas comerciales que incluyeran a *Leptospira* entre sus antígenos ("Leptospira": vacuna con varios serovares de *Leptospira*; "Reproductiva": vacuna contra diferentes patógenos que además incluían el serovar *L.* Pomona) y si se arribó a un diagnóstico presuntivo de la pérdida reproductiva. Para caracterizar mejor la prevalencia, además de calcular la prevalencia en general (≥1:200; menor dilución usada), para los serovares no adaptados al bovino, se calculó la prevalencia con títulos ≥1:800, considerados según la bibliografía internacional, como posiblemente asociados a una infección reciente.

Resultados y discusión

Se analizaron 2924 sueros bovinos, de sistemas de carne (56,7%) o leche (20,6%). En el resto (22,7%) de las muestras no estaba identificado el sistema de producción (Tabla 1). Las demás características de los vientres de los que provenían los sueros se muestran en la tabla 1. Los serovares más prevalentes fueron los adaptados al bovino: *L.* Hardjo (Lsh) (33,0%) y *L.* Wolffi (Lsw) (25,9%). Inicialmente esto demostraría la endemia existente de los serovares adaptados en nuestros rodeos, ya que valores similares se observaron incluso en animales no vacunados (sin interferencia en el diagnóstico serológico). El serovar no adaptado más prevalente fue *L.* Pomona (Lpp) (15,4%). La prevalencia del resto de los serovares no adaptados al bovino fue baja (<3%) (Tabla 1). Fue llamativa la baja seroprevalencia a Lsh en aquellos vacunados contra *Leptospira*. Es difícil establecer si este hallazgo se deba a un efecto de protección ya que generalmente estas infecciones ocurren a edad temprana, y las vacunas no suelen tener un efecto "curativo". En cambio, para Lsw, así como para los otros serovares analizados, esta disminución no fue evidente, al igual que para el caso de la aplicación de vacuna "reproductiva" (que usualmente solo incluye Lpp). Fue llamativa la baja seroprevalencia a Lsh en aquellos inmunizados con vacuna contra Leptospirosis que usualmente incluyen este serovar. Se deberían realizar más estudios para caracterizar el efecto de la vacunación en estos animales. No se observan variaciones cuando se evalúa el efecto de la edad respecto a la seroprevalencia (vacas vs. vaquillonas). El estado reproductivo del animal mostró resultados variables. Las vacas "abortadas" parecieran tener seroprevalencias más elevadas para Lsw que las "gestantes"; no se observaron grandes diferencias para otros serovares. Respecto al sistema productivo, la única serovar que mostró un comportamiento diferencial pareciera ser Lsw, con seroprevalencia mucho más alta en sistemas de carne. Para finalizar, la seroprevalencia para los serovares Lpp, Lsw y Lsh fueron más altas en los casos en los que se infirió que el aborto fue por causa de *Leptospira* spp, a diferencia de cuando se infirió otra causa infecciosa (datos no mostrados) o el diagnóstico permaneció indeterminado.

Discusión y conclusión

La Leptospirosis es una causa frecuente de abortos bovinos. Sin embargo, la interpretación serológica es compleja. Como ya ha sido postulado, se comprueba una endemia importante de los serovares adaptados al bovino, no siempre con un cuadro clínico severo como expresión. La importancia de estas infecciones como causales de otras pérdidas reproductivas (infertilidad, mermas tacto/parto, etc.) queda aún por ser estudiadas. Desde hace unos años, para la interpretación de resultados serológicos, se empezó a implementar un análisis epidemiológico, analizando animales "controles" (gestantes compañeros de los que presentan alguna pérdida reproductiva) y "tratados" (animales que presentaban la pérdida). De esta manera se trata de asociar la pérdida reproductiva con el *status* sanitario. Este acercamiento, suele ser más útil para infecciones con serovares no adaptados (debida a la pobre respuesta inmune generada). Para infecciones con serovares adaptados, la respuesta es más marcada, por lo que su identificación suele ser más sencilla.

Tabla 1: Seroprevalencia (%) a los diferentes serovares de *Leptospira* spp. analizados. Para todos los serovares se calculó la seroprevalencia total (todos los animales con anticuerpos aglutinantes ≥1:200) y para los serovares no adaptados al bovino, además se calculó la seroprevalencia ≥1:800 (entre paréntesis).

Parámetro (*n*)		Serovares no adaptados						Serovares adaptados	
		Lbc	**Lcc**	**Lgg**	**Lii**	**Lpp**	**Ltt**	**Lsw**	**Lsh**
Seroprevalencia general (*2924*)		0,9 (0,1)	1,5 (0,4)	2,6 (0,1)	1,9 (0,2)	15,4 (4,1)	1,8 (0,1)	25,9	33,0
Vacunación	Vacunados (*874*)	1,1 (0,0)	1,3 (0,9)	3,1 (0,2)	1,3 (0,0)	16,7 (3,2)	1,3 (0,2)	26, 9	27,5
	- *Leptospira* (*52*)	0,0 (0,0)	1,9 (0,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	3,9 (0,0)	5,8 (0,0)	21,2	3,9
	- Reproductiva (*822*)	1,0 (0,0)	1,2 (0,8)	3,3 (0,2)	1,3 (0,1)	17,5 (3,2)	1,0 (0,2)	27,3	28,9
	No vacunados (*155*)	0,7 (0,1)	0,0 (0,0)	0,6 (0,0)	1,9 (0,0)	5,2 (3,2)	1,3 (0,7)	31,6	39,4
Edad	Vacas (*1296*)	1,1 (0,0)	2,5 (0,7)	2,7 (0,2)	2,2 (0,2)	16,7 (7,2)	1,7 (0,3)	28,8	35,6
	Vaquillonas (*529*)	0,2 (0,0)	0,2 (0,2)	2,5 (0,2)	0,4 (0,0)	21,0 (2,8)	0,0 (0,0)	24,6	37,1
Reproducción	Abortadas (*1767*)	1,9 (0,0)	1,5 (0,5)	2,8 (0,1)	2,3 (0,1)	16,3 (5,3)	1,9 (0,2)	30,8	35,9
	Vacías (*140*)	0,0 (0,0)	1,4 (0,0)	1,4 (0,0)	1,4 (0,0)	14,3 (0,0)	0,0 (0,0)	13,6	28,6
	Gestantes (*186*)	0,0 0,00	2,7 (0,0)	0,0 (0,0)	0,6 (0,0)	14,5 (1,1)	0,0 (0,0)	18,8	31,7
Sistema	Carne (*1658*)	1,3 (0,1)	2,1 (0,7)	2,1 (0,2)	2,2 (0,2)	18,8 (4,1)	1,1 (0,2)	31,2	38,0
	Leche (*603*)	0,2 (0,0)	0,5 (0,0)	5,1 (0,2)	1,0 (0,0)	11,8 (4,0)	2,3 (0,2)	18,7	30,9
Diagnóstico	Indeterminado (*1762*)	0,3 (0,0)	1,1 (0,0)	2,7 (0,1)	1,5 (0,1)	12,5(1,5)	2,0 (0,1)	18,7	27,3
	Otra causa (*305*)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,7 (0,3)	1,3 (0,0)	7,5 (0,7)	0,0 (0,0)	27,2	31,1
	Leptospirosis (*840*)	2,4 (0,1)	3,0 (1,3)	3,1 (0,2)	2,9 (0,5)	24,3 (10,7)	2,0 (0,4)	39,6	45,7

Serogrupos y serovares analizados: Lbc: *L.* ballum castellonis; Lcc: *L.* canicola canicola; Lgg: *L.* grippotyphosa grippotyphosa; Lii: *L.* icterohaemorrhagiae icterohaemorrhagiae; Lpp: *L.* pomona pomona; Ltt: *L.* tarassovi tarassovi; Lsw: *L.* sejroe wolffi; Lsh: *L.* sejroe hardjo.

B31- EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE UN AISLAMIENTO DE MYCOBACTERIUM BOVIS OBTENIDO DE UN PULMON BOVINO POST INSPECCION EN FRIGORÍFICO

M.J. Marfil[1]; F. Blanco[1]; M. A. Colombatti Olivieri[1]; M. E. Eirin [1]; M. J. Zumárraga[1]
1- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Instituto de Biotecnología, CICVyA Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.
marfil.jimena@inta.gob.ar

Introducción

La vigilancia epidemiológica en frigorífico es una de las últimas barreras de protección para el consumidor contemplada en el Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina (SENASA, 2016). Tanto las medias reses como las vísceras son inspeccionadas visualmente y por palpación por parte del personal del frigorífico. La detección de lesiones macroscópicas en esta etapa permite el decomiso de los órganos afectados e incluso, ante lesiones diseminadas, de la res completa. Al ser la tuberculosis una enfermedad crónica, las lesiones no son siempre visibles y las micobacterias pueden encontrarse vivas sin evidenciar lesiones en los tejidos. Esto trae como consecuencia que las vísceras afectadas no siempre pueden ser detectadas y pasan la inspección bromatológica de manera inadvertida (de Kantor 1987). El modelo murino de tuberculosis pulmonar por inoculación intratraqueal ha sido utilizado para el estudio de la virulencia y transmisibilidad de distintas cepas de micobacterias (López et al, 2003). El objetivo de este trabajo fue evaluar en modelo murino la virulencia de un aislamiento de *M. bovis* obtenido de un pulmón bovino que pasó de manera exitosa la inspección bromatológica en frigorífico.

Materiales y métodos

Un aislamiento de *M. bovis* (134) obtenido a partir de un pulmón bovino de un frigorífico de la provincia de Buenos Aires, colectado luego de haber pasado con éxito la inspección bromatológica de rutina, fue seleccionado para evaluar su virulencia en el modelo murino de infección intratraqueal. Este fue caracterizado genotípicamente por *spoligotyping* (Kamerbeek et al, 1997) y VNTRs (Supply et al 2001). Como cepa de referencia se utilizó a *M. bovis* AN5 para realizar el ensayo de virulencia Para cada cepa se inocularon 18 ratones hembras de la línea BALB/c. Se inocularon bajo sedación con isofluorano, $1x10^5$ UFC de suspendidas en 100 µL de PBS de forma intratraqueal. Se programó la eutanasia de los animales (utilizando cámara de dióxido de carbono) en los tiempos 0, 30, 60 y 90 días. Para el T0 se destinaron 3 ratones/grupo, mientras que para los restantes 5 ratones/grupo. Se evaluó por necropsia el estado de los animales, registrándose el peso de cada animal como así también el peso de los bazos. Los bazos y pulmones se procesaron para recuperar las cepas por cultivo y cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC).

Resultados

Todos los animales inoculados con la cepa 134, presentaron sintomatología de consunción y taquipnea al día 16 posterior a la inoculación intratraqueal. Nueve murieron en la jaula mientras que 6 fueron eutanasiados para poder estudiar los bazos y pulmones. En la necropsia se observaron granulomas en pulmón de todos los animales inoculados con la cepa 134. Se obtuvieron cultivos a partir de bazos luego de 7 semanas. Se continuó el ensayo de los animales inoculados con la cepa de referencia *M. bovis* AN5 según lo programado.

Discusión y conclusión

Por la rapidez con que los ratones enfermaron y murieron, además de las lesiones macroscópicas producidas por esta cepa en los pulmones, se puede considerar a la cepa 134 de mayor virulencia respecto a la cepa control y a otras estudiadas previamente por el grupo de trabajo. La presencia de cepas de *M. bovis* virulentas en órganos destinados a ser comercializados en carnicerías nos alerta del riesgo zoonótico al que están expuestos tanto los trabajadores de frigorífico, como los carniceros y consumidores. La inspección bromatológica realizada en frigoríficos de forma rutinaria no permite detectar lesiones incipientes y esto permite el escape de estas micobacterias con el potencial riesgo que ello implica.

Bibliografía

de Kantor, I N, Nader, A, Bernardelli, A, Girón, D O, Man, E 1987. Tuberculous infection in cattle not detected by slaughterhouse inspection. Zentralbl Veterinarmed B. Apr; 34(3):202-205.

Kamerbeek, J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., and van Embden J., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 35:907–914.

López B., Aguilar D., Orozco H., Burger M., Espitia C., Ritacco V., Barrera L., Kremer K., Hernandez-Pando R., Huygen K., van Soolingen D., 2003. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. Clin. Exp. Immunol., 133(1):30-7.

Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D and Locht C. 2001. Automated High-Throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. J.Clin. Microbiol.Vol. 39, (10), 3563-3571.

http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-128-2012-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria

B32- *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*: DESCRIPCIÓN DE UN CASO EN BOVINOS Y ASPECTOS DEL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

F. Cheuquepán[1], L. Colque[1], I. Llada[1], P. Calandra[2], F. Paolicchi[1], G. Cantón[1], E. Odriozola[1], E. Morrell[1], M.A. Fiorentino[1]
[1]INTA EEA Balcarce. [2]Actividad Privada. eeabalcarce.residsa@inta.gob.ar

Introducción. *Yersinia pseudotuberculosis* es una bacteria que afecta a una amplia gama de mamíferos. Posterior a la infección oral, las lesiones intestinales pueden desarrollarse resultando en un cuadro de enterocolitis piogranulomatosa en bovinos, ovinos, caprinos menores de 1 año de edad. Si el cuadro progresa a bacteriemia, se puede presentar una septicemia fulminante. Las infecciones en bovinos han sido reportadas como esporádicas asociadas con aborto, mastitis, neumonía y enfermedad entérica. El objetivo de este trabajo es hacer la descripción de un caso de yersiniosis intestinal diagnosticado por el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) del INTA Balcarce, utilizando técnicas de diagnóstico tradicionales, resaltando los procedimientos necesarios para su aislamiento.

Materiales y métodos. En un brote ocurrido en el mes de agosto de 2017, en un lote de 70 terneras Aberdeen Angus de 1 año de edad, se presentó la muerte aguda de 3 animales en un lapso de 3 semanas. Además se observó la presencia de 6 animales que manifestaron caquexia y diarrea acuosa de color verde-oscuro y olor fétido. En el momento de la visita al establecimiento, se procedió a realizar la eutanasia *in extremis* de una ternera afectada que no había sido tratada con antibióticos. Además se realizó la necropsia de un animal que había muerto previamente. Se realizó el correspondiente estudio *post mortem* y se recolectaron muestras de diferentes tejidos en formol tamponado al 10% para realizar estudios histopatológicos. Se recolectaron muestras de contenido abomasal y materia fecal para realizar el conteo de huevos por gramo (HPG) de nematodes gastrointestinales y ooquistes de coccidios (OPG). Se obtuvieron 2 muestras de suero para determinar la concentración de albúmina (ALB), proteínas totales (PT) y pepsinógeno (PEP) por espectrofotometría. Para cultivo bacteriano se tomaron muestras de contenido intestinal, hígado y linfonódulo mesentérico. Estas últimas fueron sembradas de forma directa en medio agar Columbia (ASC) adicionado con 7% de sangre bovina y agar McConkey (MC) e incubadas en aerobiosis a 37°C durante 48 y 24 horas, respectivamente. Adicionalmente todas las muestras fueron cultivadas de manera directa en medio XLD para diagnóstico de *Salmonella* entérica y en medio tetrationato (de enriquecimiento y selectivo) del cual se realizaron pasajes a XLD cada 48 hs. Dados los resultados histopatológicos, cinco días después de realizada la extracción de la muestra de intestino del animal eutanasiado, mantenida a 4ºC, se le realizó un raspaje profundo, se "enriqueció en frío" durante 15 días con sub-cultivos semanales en placa medio selectivo Cefsulodina-Novobiocina-Irgasan (CNI) para *Yersinia spp*. y MC. Los mismos fueron incubados a 37°C en aerobiosis e inspeccionados en busca de colonias sospechosas a las 24 h. El enriquecimiento en frío consistió en incubar la muestra de raspaje de mucosa a 4°C en solución *buffer* salina al 5% con subcultivos semanales en los medio de cultivo ASC, CNI, MC y XLD. Se realizó tipificación de la cepa aislado mediante movilidad a 37°C y temperatura ambiente, reducción de nitratos, producción de gas y SH_2, Indol, oxidasa, orto-nitrofenil-β-galactosidasa, catalasa, rojo de metilo, Simons-citrato, catalasa, ornitina descarboxilasa, Voges Proskauer, fenilalanina, tartrato, malonato, urea, hidrólisis de la esculina, utilización de azucares (glucosa, lactosa, sorbitol cellobiosa, sacarosa, trehalosa, ramnosa, melibiosa, arabinosa, xilosa, salicina, maltosa, manitol). En una muestra de bazo y linfonódulo mesentérico de la ternera eutanasiada se realizó aislamiento en cultivos celulares para el virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) y Herpesvirus bovino 1 (HVB-1). Además, se empleó un test de cromatografía de flujo lateral en muestra de pabellón auricular e inmunohistoquímica (IHQ) a partir de cortes de intestino para detectar el VDVB. Se realizó seroneutralización para la detección de anticuerpos contra HVB-1 y vDVB en el suero de la ternera eutanasiada.

Resultados. En la necropsia del animal eutanasiado se observó congestión difusa de la mucosa cecal y lesiones circulares multifocales sobreelevadas de 1 cm de diámetro con una depresión central. En la necropsia del animal que había muerto espontáneamente, se observaron múltiples lesiones nodulares multifocales de 0,5 cm de diámetro en la mucosa de colon e íleon, con un centro caseoso amarillento y firme, que se desprendía al tacto dejando una lesión ulcerativa. El análisis histopatológico de ambos animales reveló una enterocolitis multifocal necrotizante con herniación de las criptas y trombosis en la submucosa y hepatitis multifocal linfohistiocítica con necrosis. En el animal eutanasiado además se observaron agrupaciones de cocobacilos Gram negativos en la mucosa y submucosa del intestino delgado y presencia focalizada de pseudomembranas. Las concentraciones plasmáticas de ALB y PT se encontraban por debajo de los valores de referencia, mientras que el PEP resultó normal. La seroneutralización y el aislamiento viral, la cromatografía lateral e IHQ fueron negativas para el vDVB. Los conteos de HPG y OPG fueron bajos, y no se visualizaron ooquistes en las improntas de ciego. A las 24 h, se observó el desarrollo de colonias lactosa positivas en el medio MC y colonias grises no hemolíticas en el ASC, caracterizadas mediante bioquímicas clásicas como *E. coli*. El cultivo de *Salmonella* spp. resultó negativo. La siembra diferenciada en agar CNI y MC posterior al "enriquecimiento en frío" de la muestra permitió en el primer subcultivo evidenciar en el medio CIN colonias con centros de color rojo intenso rodeadas de un borde pálido y transparente (colonias en "ojo de toro") y en el medio MC pequeñas colonias lactosa negativas. Las mismas se repicaron y se realizaron bioquímicas clásicas para clasificarlas finalmente como *Yersinia pseudotuberculosis*.

Discusión y conclusión. Basado en el cuadro clínico observado en los animales, las lesiones macroscópicas y microscópicas, y finalmente el aislamiento de *Y. pseudotuberculosis* a través de un cultivo selectivo, se pudo confirmar en las terneras necropsiadas, un cuadro de yersiniosis intestinal. En las afecciones entéricas no siempre se puede lograr una identificación del patógeno dado la gran cantidad de microbiota presente en el contenido intestinal/material fecal, además siendo algunas bacterias con potencial patógeno. Al momento del abordaje diagnóstico de la mayoría de las infecciones intestinales, se tiende a enfocar en los dos o tres patógenos más frecuentemente aislados en animales con diarrea (*Salmonella spp, Escherichia coli).* No siempre se tienen en cuenta a otras enterobacterias patógenas menos frecuentes tales como *Yersinia spp.* La resiembra de las muestra de intestino en un medio selectivo con un pre-enriquecimiento en frío previo, fue clave para lograr el diagnóstico etiológico de este caso. Este enriquecimiento facilita el aislamiento de yersinias presentes en bajo cantidad desde muestras con alta carga bacteriana. Cabe señalar que *Yersinia spp.* en los medios de cultivo tradicionales y a temperaturas de cultivo para bacterias mesófilas, puede ser enmascarada por el crecimiento de otros microorganismos, en especial cuando se utilizan muestras como contenido intestinal. Las características psicrófilas de *Yersinia spp* fueron aprovechadas para el cultivo diferencial. Éstas características, combinadas con factores estresantes ambientales y del manejo del rodeo, podría contribuir al aumento de las infecciones por *Y. pseudotuberculosis* en los meses de invierno. En conclusión, ante la presencia de cuadros entéricos, con lesiones no típicas, se debería tener en cuenta la intervención de otros agentes patógenos menos frecuentes dentro de los cuadros diferenciales. Esto resalta la importancia de un muestreo completo, el trabajo integrado entre laboratorios y el resguardo del material colectado hasta el término de las pruebas diagnósticas.

Bibliografía. Brown y Davis. 1989. J. Camp. Path. Vol. 101
Callinan *et al*. 1988. Aust Vet J 65:8-11 -Foster *et al*. 2008. Vet J 175:139–140 -Niskanen. 2010. University of Helsinki.

B33- DETECCIÓN DE *CAMPYLOBACTER FETUS* ADHERIDOS A ESPERMATOZOIDES BOVINOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR

C.I. Cagnoli [1,2,3], M. L. Chiapparrone [3], M. Galland Pinard [3], J.A. Passucci [2,4], M. Catena [2,3]
1. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. 2. NACT. SAMP. Unidad Ejecutora de CONICET (CIVETAN).
3. Área de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. 4. Área de Epidemiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. ccagnoli@vet.unicen.edu.ar

Introducción

La campilobacteriosis bovina es una enfermedad infecciosa de transmisión venérea causada por *Campylobacter fetus venerealis* (CFV) y *Campylobacter fetus fetus* (CFF), que se caracteriza por producir mortalidad embrionaria y abortos. Es una enfermedad que genera grandes pérdidas económicas, la prevalencia estimada en la provincia de Buenos Aires es del 9,8 - 15,3% (INTA, 2017).

El diagnóstico se realiza mediante inmunofluorescencia directa en muestras de esmegma prepucial, de mucus cérvico-vaginal de hembras con fallas reproductivas y de líquido de abomaso de fetos abortados. Esta técnica no permite diferenciar las subespecies, para lo cual debe recurrirse al cultivo, identificación bioquímica y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Hasta el momento se han descripto varios protocolos de PCR, uno de ellos corresponde a Hum *et al.* (1997), que se ha utilizado principalmente sobre cultivos puros de *Campylobacter fetus* pero no sobre muestras clínicas.

Para el estudio de esta enfermedad en nuestro grupo de trabajo se han aplicado diferentes modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Los modelos *in vitro* se basaron en la fertilización de ovocitos bovinos, el cultivo de embriones murinos y los cultivos primarios de células vaginales y uterinas. En ensayos con espermatozoides bovinos se demostró que *Campylobacter fetus venerealis* tiene la capacidad de adherirse (Chiapparrone *et al*, 2016). Esto motivó el desarrollo de un modelo *in vitro*, en el que se evaluaron diversos parámetros espermáticos como indicadores de patogenicidad: vitalidad espermática, integridad y funcionalidad de la membrana plasmática, integridad del ADN, reacción acrosómica y porcentaje de espermatozoides con *Campylobacter fetus* adheridos. Los resultados indicaron en el 100% de las muestras que un 40-50% de los espermatozoides presentan *Campylobacter fetus* adheridos (Cagnoli *et al*, 2017).

El objetivo del presente trabajo fue utilizar un *kit* de extracción y purificación de ADN y un protocolo de PCR para detectar *Campylobacter fetus* adheridos a espermatozoides bovinos.

Materiales y métodos

Se utilizaron 29 pajuelas de semen bovino congelado aptas para los valores de motilidad progresiva, vigor, número de espermatozoides, morfología y calidad microbiológica. El semen contenido en cada pajuela fue dividido en 3 grupos (control, inoculado con una cepa de CFF, inoculado con una cepa de CFV). Los grupos inoculados recibieron una dosis de *Campylobacter fetus* (UFC/mL) en una relación *Campylobacter fetus:* espermatozoide de 2:1. Como parte del procesamiento para evaluar la adhesión, los espermatozoides fueron centrifugados (200 g) y lavados con PBSs pH 7,2 para eliminar todo *Campylobacter fetus* no adherido. El *pellet* obtenido (350 µL) fue procesado para coloración y para extracción de ADN. El ADN fue extraído y purificado mediante el Wizard Genomic DNA Purification *Kit* de Promega®, siguiendo el protocolo correspondiente a microorganismos Gram negativos. Este protocolo requiere un volumen inicial de 1 mL, el cual fue modificado a 350 µL (citado anteriormente).

La técnica de PCR fue realizada de acuerdo al protocolo establecido por Hum *et al.* (1997) utilizando los pares de *primers* MG3F - MG4R y VenSF - VenSR, con modificaciones en el protocolo según se detalla. El *cocktail* de reacción de la PCR se realizó en una solución de agua bidestilada de calidad molecular (Invitrogen), buffer TAS 1X (B0214), MgCl2 2,8 mM (M0192), 0,01% de gelatina, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada *primer,* 1U/µL de *Taq* DNA polimerasa 500 U (5000 U/mL) (E1201) (*Kit* T-Plus ADN Polimerasa. Inbio Highway) y 3 µL de ADN. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico (T-18 IVEMA) con el siguiente programa: desnaturalización 96 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos: 96 °C, 15 seg; 60 °C, 1 min; 72 °C, 3 min, y la extensión final a 72 °C por 3 min. El análisis de los productos de la PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos con Gel Red y visualización en transiluminador UV. Los resultados fueron analizados por test Chi^2 (InfoStat Versión 2017).

Resultados

Se analizaron un total de 58 muestras de semen, correspondientes a los grupos inoculados: 29 con una cepa de CFF y 29 con una cepa de CFV.

En las muestras inoculadas con CFF (29), en 18 se detectó CFF (62%) y las restantes fueron negativas. En las inoculadas con CFV (29), en 13 se detectó CFV (44,8%), en cinco (17,2%) no se observó el amplicón de 142 pb correspondiente a CFV y las restantes fueron negativas.

Los resultados obtenidos por test Chi^2 demostraron que la asociación entre las subespecies y la capacidad de detección de las mismas no es significativa ($p>0,05$), por lo tanto la técnica tendría igual capacidad de detectar tanto CFF como CFV.

Discusión y conclusiones

En el presente trabajo se describe por primera vez la aplicación de un *kit* de extracción de ADN y la técnica de PCR sobre espermatozoides bovinos. Esta metodología permitió la detección de *Campylobacter fetus* adherido a los espermatozoides en un 62% de las muestras de semen analizadas. En referencia a las muestras en las que no se detectó *Campylobacter fetus* o el amplicón de CFV, podría inferirse una falla en la extracción de ADN o una cantidad insuficiente de microorganismos en la alícuota inicial. La mayoría de las muestras en las que no se logró la detección, eran provenientes de pajuelas con menor número de espermatozoides inicial y por lo tanto, menor UFC/mL inoculados. Además se debe considerar que la alícuota inicial utilizada en el *kit* fue menor a la recomendada por el fabricante.

Bibliografía

-Cagnoli, C.I.; Chiapparrone, M. L.; Daglio, M.C.; Cacciato, C.; Soto, P.; Catena, M. (2017). Desarrollo de un modelo *in vitro* para el estudio de la patogenicidad de *Campylobacter fetus* sobre espermatozoides bovinos. Libro de resúmenes XLV Jornadas Uruguayas de Buiatría: 186-189.

-Chiapparrone, M. L.; Soto, P.; Catena, M. (2016). Characterization of the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* adhesion to bovine sperm cells. Int. J. Morphol., 34 (4): 1419-1423.

- Hum, S.; Quinn, K.; Brunner, J.; On, SLW. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. Aust. Vet. J., 75(11):827-831.

B34- RESULTADOS DE LA DETECCION POR PCR DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EN LECHE BOVINA DE RODEOS EN SANEAMIENTO DE LA PROVINCIA DE SANTA FE

MJ. Marfil[1]; N. Griffa[1]; D. Moyano[1]; F. Martino[2]; ME. Eirin[1]; MI. Romano[1]; MJ. Zumárraga[1]
1- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Instituto de Biotecnología, CICVyA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. 2-Actividad privada
zumarraga.martin@inta.gob.ar

Introducción

La detección de bovinos lecheros con tuberculosis es obligatoria y está enmarcada en el plan de control y erradicación de tuberculosis bovina que se encuentra vigente en nuestro país desde el año 2012. Si bien la técnica oficial de diagnóstico es la intradermorreacción (IDR) que evidencia la respuesta inmune mediada por células, existen técnicas complementarias como la prueba de ELISA que detecta inmunidad humoral y la técnica de PCR en leche, que detecta ácidos nucleicos del patógeno. Esta última ha sido eficaz en la detección de la excreción de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) tanto en leche individual como en leche de tanque. Es así como el plan regional de Santa Fe incorporó la técnica de PCR en leche para detección de *M. bovis* en la vigilancia epidemiológica de rodeos libres (Anexo Resol 949/12 ministerio de la producción de Santa Fe, 2012). El objetivo de este trabajo fue detectar por PCR la excreción por leche de *M. bovis* en 2 rodeos en saneamiento de la provincia de Santa Fe, positivos por IDR o ELISA.

Materiales y métodos

Se realizó el seguimiento de 2 rodeos lecheros de la región centro-oeste de la provincia de Santa Fe, con 440 y 220 animales Holando-Argentino en producción, de dos tambos con una prevalencia de tuberculosis de 6 y 11% respectivamente. Los animales fueron sometidos previamente a la prueba de IDR y la de ELISA. Se tomaron muestras de leche de los animales positivos por IDR o ELISA y se conformaron dos grupos de estudio: 42 animales negativos por IDR y positivos por ELISA (grupo 1) y 18 animales positivos por IDR y negativos por ELISA (grupo 2). Adicionalmente se tomaron 2 muestras de leche de tanque para cada uno de los rodeos. La leche fue procesada mediante digestión enzimática con Proteinasa K y posteriormente se realizó la extracción con solventes orgánicos fenol cloroformo isoamílico (FCI) precipitando el ADN total con isopropanol en medio salino (Zumarraga *et al*., 2012). Este ADN se usó como templado para amplificar un fragmento de 448 pb de Rv2807 (Araújo, et al 2014), presente en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), mediante PCR con la modificación de *Touch-down* (Zumarraga *et al*., 2005; 2012). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV. Se calculó el Valor Predictivo Positivo (VPP) y Negativo (VPN) de la PCR.

Resultados y discusión

En el grupo 1 (IDR negativo y ELISA positivo) el 28,57% (12/42) de las leches fueron positivas por PCR-Rv2807. En el grupo 2 (IDR positivo y ELISA negativo) el 22,2% (4/18) de las leches fueron positivas por PCR-Rv2807. Una de las dos muestras de leche de tanque fue positiva por PCR y correspondió al tambo con 6% de prevalencia de tuberculosis. El VPP y VPN de la PCR-Rv2807 frente a IDR fue de 25 y 68% respectivamente mientras que frente al ELISA fue de 75 y 31% respectivamente.

Discusión y conclusiones

Se ha documentado previamente que es posible detectar a partir de leche bovina y leche de tanque la presencia de micobacterias del CMT mediante la técnica de PCR (Zumárraga *et al*., 2012).

En la provincia de Santa Fe se utiliza para realizar vigilancia epidemiológica en rodeos saneados. Sin embargo, consideramos que en casos especiales de saneamiento con animales anérgicos que ya no pueden ser detectados por la IDR es una herramienta de utilidad para complementar el diagnóstico. Al respecto, el VPP de la PCR en el grupo de animales ELISA positivos fue de 75%. Por otra parte, no todos los animales diagnosticados previamente como positivos por alguna de las dos técnicas fueron excretores de micobacterias por glándula mamaria, en concordancia con otros autores que indican que la liberación de micobacterias por leche se realiza de forma intermitente y hasta en un 30% de los animales infectados (Perez *et al*., 2002). Otro hallazgo de importancia es la detección de micobacterias del CMT en la leche del tanque utilizada para la alimentación de terneros del establecimiento. Esto indica un problema de manejo del rodeo que representa un riesgo de transmisión para los animales de corta edad que puede ser remediado con tratamiento térmico de esta leche. Debido a la complejidad del diagnóstico de la enfermedad, además de las pruebas oficiales hay que considerar la utilización de pruebas complementarias ya que contribuyen a la identificación precoz de animales que actúan como activos transmisores de la infección.

Bibliografía

Araújo CP, Osório AL, Jorge KS, Ramos CA, Filho AF, Vidal CE, Roxo E, Nishibe C, Almeida NF, Júnior AA, Silva MR, Neto JD, Cerqueira VD, Zumárraga MJ, Araújo FR. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. PLoS One. 2014 Mar 11; 9 (3):e91023.

Pérez A, Reniero A, Forteis A, Meregalli S, López B, Ritacco V. Study of *Mycobacterium bovis* in milk using bacteriological methods and the polymerase chain reaction. Rev Argent Microbiol 2002; 34:45–51.

SENASA Res. 128/2012. Anexo Resol 949/12 ministerio de la producción de Santa Fe.

Zumárraga MJ, Soutullo A, García MI, Marini R, Abdala A, Tarabla H, Echaide S, López M, Zervini E, Canal A, Cataldi AA. Detection of *Mycobacterium bovis*-infected dairy herds using PCR in bulk tank milk samples. Foodborne Pathog Dis. 2012; 9 (2):132-7.

Zumárraga MJ, Meikle V, Bernardelli A, Abdala A, Tarabla H, Romano MI, Cataldi A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. J. Vet. Diagn. Invest. 2005; 17(3):232-8.

B35- VALORACION DE RESISTENCIA BACTERIANA EN NEUMONIAS EN BOVINOS DE ENGORDE A CORRAL

MG. de Yaniz[1], MA. Fiorentino[2], F. Paolicchi[2], AR. Bence[1], MP. Domínguez[1], S. Sánchez Bruni[1]
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Centro de Investigación Veterinaria Tandil (CIVETAN) CONICET, Tandil, Argentina; [2]Grupo Sanidad Animal, EEA, INTA Balcarce.
gdeyaniz@vet.unicen.edu.ar.

Introducción

La enfermedad respiratoria bovina (ERB) es causante de pérdidas económicas en animales de engorde a corral en Argentina y en el mundo. Las principales bacterias involucradas en la patogenia de esta enfermedad son *Histophilus somni, Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*, y en menor medida *Mycoplasma bovis* y *Trueperella pyogenes*. Nuestro país carece de datos oficiales sobre la distribución de la microbiota orofaríngea de bacterias productoras de ERB como así también, sobre la caracterización de cepas resistentes a los antimicrobianos utilizados en este sistema (1). El objetivo de este trabajo fue valorar la resistencia a antimicrobianos en cepas bacterianas obtenidas de pulmones de bovinos muertos por neumonía en engordes a corral en la región del sudeste de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Materiales y métodos

En el periodo comprendido entre 2016 y 2018, se realizaron 55 necropsias de bovinos con diagnóstico definitivo de ERB y que fueron refractarios a tratamientos con antimicrobianos. Se tomaron muestras de pulmón estéril, las mismas fueron cultivadas en Agar sangre Columbia en atmósfera con 5-10% de CO_2 y en Agar Mc Conkey en aerobiosis a 37° C durante 48 y 24 h, respectivamente. La identificación de género y especie se realizó mediante pruebas bioquímicas clásicas. La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas se realizó *in vitro* por el método de Kirby-Bauer utilizando discos individuales de Amoxicilina (10 µg), Ampicilina (10 µg), Amoxicilina/Clavulánico (20/10 µg), cefotaxima (5 µg), ceftiofur (30 µg), ceftriaxona (30 µg), enrofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), gamitromicina (15 µg), tilmicosina (15 µg), florfenicol (30 µg), gentamicina, oxitetraciclina (30 µg), trimetoprima/sulfas (1,25/23,75 µg) siguiendo las especificaciones del CLSI VET08 (5).

Resultados

Se lograron aislar en total 59 cepas, siendo 19 de *P. multocida,* 18 de *M. haemolytica* y 22 de *H. somni*. Los resultados de resistencia antimicrobiana se presentan en la Tabla 1. Se observaron cepas bacterianas multirresistentes, es decir que presentaron resistencia a 3 o más clases de agentes antimicrobianos, siendo el 13,6% (3/22) *H. somni,* el 27,7% (5/18) *M. hemolytica* y el 31,6% (8/19) *P. multocida*.

Discusión y conclusión

Este trabajo permitió obtener resultados de resistencia a antimicrobianos que no son utilizados frecuentemente en engordes a corral. Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos macrólidos por codificar para el gen de resistencia *erm*. La alta resistencia encontrada para eritromicina concuerda con lo reportado en otros países ya que este antibiótico (de alta implicancia en medicina humana) comparte el gen *erm* con tilosina, macrólido ampliamente utilizado como aditivo en alimento para ganado, para evitar abscesos hepáticos producidos por *T. pyogenes* (4). Los resultados obtenidos indican un aumento de resistencia en las bacterias estudiadas a algunos de los antimicrobianos previamente valorados, según Fiorentino y col (2) y Margineda y col (3). El incremento de resistencia a antimicrobianos de bacterias productoras de ERB, podría ser debido a la alta presión farmacológica que sufren los bovinos sometidos al consumo permanente de alimento con antibióticos, a la implementación de tratamientos farmacológicos empíricos, a la falta de precisión en el diagnóstico de la patología y fundamentalmente a la falta de armonización sobre protocolos terapéuticos que deberían implementarse ante un brote de esta enfermedad.

Bibliografia

1. de Yaniz y Sánchez Bruni. Aspectos fármaco-epidemiológicos de la enfermedad respiratoria bovina bacteriana en feedlots. Una problemática a resolver. Rev vet 26 (2): 160-167, 2015.
2.Fiorentino, Moreira, Malena, Mendez, Paolicchi. Sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* aisladas de pulmones bovinos XIX Reunión Científico Técnica de la AAVLD, BsAs, 2012.
3.Margineda, Bessone, Rüegger, Pianetti, Morao, Piscitelli, Zielinski. II Jorn Lat Fac Cs Vet, UNR, Rosario, 2014.
4.Mantz, Miller, Spiehs, Woodbury and Durso. Persistence of erythromycin resistance gene erm (B) in cattle feedlot pens over time. Agric. Food Anal. Bacteriol. Vol3: 3, 2013.
5. VET084Ed. Performance standards for antimicrobial disc and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. 2018

Tabla 1. Resultados de la prueba de sensibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer en bacterias aisladas de animales con ERB

Antimicrobianos	Número (%) de cepas resistentes		
	P. multocida	*M. haemolytica*	*H. somni*
Amoxicilina	4/19 (21%)	0/18 (0%)	2/22 (9%)
Ampicilina	5/19(26,3%)	3/18 (16.7%)	2/22 (9,1%)
Amoxicilina/Ac. Clavulánico	5/19 (26.3%)	2/18 (11,1%)	0/22 (0%)
Cefotaxima	0/19 (0%)	1/18 (5.5%)	0/22 (0%)
Ceftiofur	0/19 (0%)	0/18 (0%)	0/22 (0%)
Ceftriaxona	3/19 (15,8%)	5/18 (27,8%)	3/22 (13,6%)
Enrofloxacina	4/19 (21%)	4/18 (22,2%)	1/22 (4,5%)
Eritromicina	17/19 (89,4%)	17/18 (94,4%)	15/22 (68,2%)
Gamitromicina	0/19 (0%)	0/18 (0%)	0/22 (0%)
Tilmicosina	1/19 (5.3%)	0/18 (0%)	0/22 (0%)
Florfenicol	0/19 (0%)	0/18 (0%)	0/22 (0%)
Gentamicina	3/19 (15,8%)	3/18 (16,6%)	2/22 (9,1%)
Oxitetraciclina	2/19 (10,5%)	7/18 (38,8%)	3/22 (13,6%)
Trimetoprima + sulfas	3/19 (15,8%)	0/18 (0%)	0/22 (0%)

B36- EXPERIENCIA EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS OVINA

G. Magnano[1]; E. Sticotti[1]; A. Macias[1]; M. Macio[1], M. Zumárraga[2]; MJ. Marfil[2]; M. Schneider[1]; J. Giraudo[1]
1 Departamento de Patología Animal. Facultad
de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. gmagnano@ayv.unrc.edu.ar
2 Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Hurlingham, Argentina.

Introducción

En los últimos años, el diagnóstico de tuberculosis en las ovejas, está teniendo mayor importancia, principalmente por la posibilidad de transmitir la enfermedad a los bovinos (Muñoz Mendoza y col. 2016). Sin embargo, todavía no es una práctica frecuente y la información disponible en Argentina es escasa.

El objetivo del presente trabajo es comunicar la experiencia obtenida en el abordaje de tres casos de tuberculosis ovina.

Materiales y métodos

En todos los casos el diagnóstico *in vivo* fue mediante la técnica de intradermorreacción (IDR) con derivado proteico purificado bovino (DPP bovino). Se realizaron necropsias de ocho (8) animales reaccionantes (PPD+), histopatologías, cultivos para micobacterias a partir de tejidos con lesiones compatibles o de linfonódulos mesentéricos, mediastínicos, retrofaríngeos y gastrohepáticos en caso de no observarse lesiones. También se tomaron muestras de hisopados nasales de algunos ovinos reaccionantes positivos y negativos y del ambiente. Se cultivaron en medios de Löwenstein-Jensen y Stonebrink y los aislamientos obtenidos se identificaron por secuenciación de 16S ARNr y posterior comparación de las secuencias génicas en bases de datos.

Caso 1: majada de 40 ovinos y **Caso 2:** majada de 50 ovinos. Ambas compartían establecimientos con bovinos que tenían antecedentes de tuberculosis. **Caso 3**: majada de 30 ovinos sin relación con bovinos. Todas las majadas se ubicaban en el departamento Río Cuarto.

Resultados

Los mismos se presentan en el siguiente cuadro.

	Caso 1		**Caso 2**		**Caso 3**	
Nº tuberculinizados	40		50		30	
Positivos a IDR (%)	4 (10%)		2 (4%)		16 (53%)	
Nº necropsias	3		2		3	
Ovinos con lesiones macroscópicas	2		0		0	
Ovinos con lsiones microscópicas	2		0		0	
Cultivo positivo de tejido y tipificación	2 (ambos *M. bovis*)		0		0	
Hisopados nasales	Total	Aislamiento.	Total	Aislamiento	Total	Aislamiento
IDR +	4	1 (S/T)	2	1 (MNT)	6	*M.terrae(1) M.flavescens(1) M. nonchromogenicum (1)*
IDR -	0		8	Negativos	4	*M. rhodesiae(1)*
Micobacterias de ambiente	N/R		N/R		Agua: *M. avium*	

MNT: Micobacterias No Tuberculosa S/T: sin tipificar N/R: no realizado

Discusión y conclusiones

En el caso 1, los ovinos que compartieron ambientes con bovinos infectados, se contagiaron con el mismo agente. Las reacciones a la IDR fueron mayormente coincidentes con la aparición de lesiones macro y microscópicas y aislamiento del agente, en este caso *M. bovis*. A diferencia de los observado por otros autores (Muñóz Mendoza y col. 2016, Gomez y col. 2013,) las lesiones fueron localizadas y solamente en ganglios linfáticos mesentéricos.

En el caso 2 a pesar de compartir con bovinos infectados, no se observaron lesiones ni aislamiento en los necropsiados. No obstante, se aisló una MNT en uno de los hisopados de un animal IDR+.

En el caso 3 se podría inferir que habrían existido reacciones cruzadas al DPP bovino, causadas por micobacterias no tuberculosas (que fueron detectadas tanto en hisopados nasales como en el agua de bebida) y por ser oportunistas explicaría la ausencia de lesiones. Elaborar tuberculinas con algunas de estas micobacterias y evaluar en los ovinos, tal lo estudiado por Oriani y col. (2011) en bovinos, ayudaría a mejorar la interpretación de los resultados Otra posibilidad es la infeción con *M avium subesp paratuberculosis* (Jorge y col. 2000.) por lo que se aconsejaría la utilización de la técnica comparada (DPP bovino y DPP aviar) que podría mejorar el diagnóstico. Si bien no se descartó paratuberculosis, no se observaron síntomas clínicos, ni lesiones macroscópicas o microscópicas que hicieran sospechar la presencia de la misma.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que el comportamiento epidemiológico, patológico y los resultados de las pruebas diagnósticas no siguieron un patrón lineal. Por lo tanto se hace totalmente necesario profundizar los estudios sobre la enfermedad en esta especie.

Bibliografía

-Gomez S.; Navarro J.; Ramis G.; Sanchez P. 2013. Tuberculosis generalizada en un cordero. AN. VET. (Murcia) 29: 111-115.

-Jorge C.; Schettino D.; Torres P.; Bernardelli A. 2000. Primera descripción de infección concomitante de tuberculosis y paratuberculosis en ovinos leheros en Argentina. Rw. Sci. Tech. Off. int. Epiz. 19(3), 800-809.

-Marianelli C.; Cifani N.; Capucchio MT.; Fiasconaro M.; Russo M.; La Mancusa F.; Pasquali P.; Di Marco V. 2010. Un caso de tuberculosis bovina generalizada en una oveja. J Vet Diagn Invest. 22(3): 445-448.

-Muñoz-Mendoza M.; Romero B.; Del Cerro A.; Gortázar C.; García-Marín JF.; Menéndez S.; Mourelo J.; de Juan L.; Sáez JL.; Delahay RJ.; Balseiro A. 2016. Sheep as a potential source of bovine TB: epidemiology, pathology and evaluation of diagnostic techniques. Transbound Emerg Dis. 63(6):635-646.

-Oriani S.; Dubarry J.; Errea A.; Vera O.; Alfonso M.; Cavagiòn L.; Staskevich A. 2011. Asociación entre el diagnóstico de Tuberculosis bovina por intradermorreacción, la anatomopatología, la bacteriología y la posible interferencia con micobacterias ambientales. Revista Universidad Nacional de La Pampa, Ciencia Veterinaria, 13(1).

B37- RESISTENCIA BACTERIANA EN AISLAMIENTOS PROVENIENTES PIEL Y FANERAS DE CANINOS Y FELINOS DURANTE 2016-2018

G. Retamar[1], P. Franco[1], J. Gallardo[1], M. Fernández[1], K. Castillo[1], A. Perez[1], N. Lanza[1], N. Sarcone[1], A. Etchecopaz[1], C. Bustos[1], M. Mesplet[1], A. Muñoz[11]
Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Enfermedades Infecciosas.
laboratorioinfeccio@fvet.uba.ar

Introducción

El sistema tegumentario constituye un órgano de defensa para las agresiones externas. Cuando se pierde la integridad de esta superficie, la piel se erosiona y frente al contacto continuo con situaciones adversas, y la consecuente alteración de la flora, se pueden generar infecciones cutáneas. El agente etiológico primario de las piodermias en pequeños animales es el *Staphylococcus intermedius*. Las piodermias profundas pueden ser inducidas por cualquier microorganismo incluidas también, las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli, Proteus* spp., *Pasteurella multocida* spp., ésta última, de mayor importancia en felinos). El uso empírico rutinario en la clínica de pequeños animales de tratamientos antimicrobianos sin el previo aislamiento y prueba de susceptibilidad antimicrobiana del agente productor de la lesión podría acelerar el surgimiento y la proliferación de organismos resistentes a los agentes antimicrobianos. Esta situación implica una amenaza considerable para la salud humana y la sanidad animal. El objetivo de este trabajo fue determinar la resistencia bacteriana de bacterias aisladas de muestras de piel y faneras, provenientes de caninos y felinos procesadas en el Laboratorio Escuela de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas (LEEI) durante 2016-2018.

Materiales y métodos

Se analizaron muestras provenientes de 18 caninos y 3 de felinos que fueron procesadas durante el período comprendido entre abril de 2016 y julio de 2018. Dichas muestras fueron sembradas en agar trípteina soya por 24 hs a 37°C y fueron identificadas mediante el esquema propuesto por Cowan (2006). El antibiograma se realizó mediante el método de difusión en placa, en el medio Mueller Hinton agar, con un inóculo de suspensión bacteriana ajustado a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland según *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013) y se incubaron 24 hs a 37°C. Se testearon antibióticos pertenecientes a los siguientes grupos: aminopenicilinas, quinolonas, sulfonamidas para ambos grupos de bacterias; lincosamidas, tetraciclinas, y cefalosporinas de 1^{era} y 3^{era} generación sólo para los cocos Gram positivos y aminoglucósidos sólo para bacilos Gram negativos. La lectura se realizó mediante la medición de los halos de inhibición y posterior comparación con los puntos de corte indicados de referencia. Se trabajó con un total de 26 aislamientos bacterianos, de los cuales 6 aislamientos correspondían a bacilos Gram negativos (entre las que se encuentran 3 *Escherichia coli, 1 Proteus* spp.,*1 Pseudomonas aeruginosa,1 Klebsiella* spp) y 20 aislamientos correspondían a cocos Gram positivos (4 *Staphylococcus aureus, 9 Staphylococcus* spp., *5 Streptococcus* spp., *2 Micrococcus* spp).

Resultados

Analizando los 26 aislamientos se observó un 42% de multirresistencia (resistencia a 3 o más grupos de antimicrobianos) en los microorganismos evaluados, presentándose la misma en el 50% de los Gram negativos y el 40% de los Gram positivos. En los aislamientos de bacilos Gram negativos, la resistencia varió entre un 80% y un 100% en la mayoría de los antimicrobianos testeados, solo hacia las quinolonas se observó sensibilidad del 100% en las bacterias evaluadas (Grafico 1). Mientras que en los aislamientos de cocos Gram positivos, la resistencia varió entre 43% y 78%, resultando el 100% sensibles a las aminopenicilinas (Grafico 2)

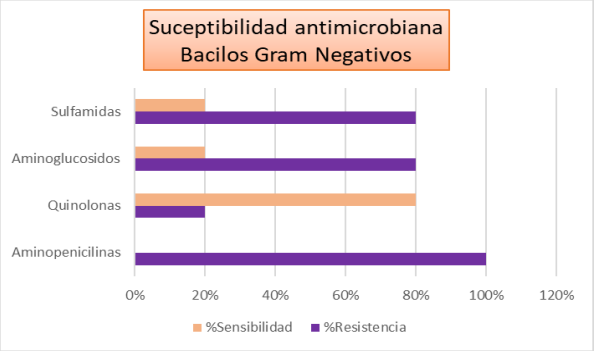


Gráfico 1: Susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli. Pseudomonas aeruginosa, Proteus* spp. y *Klebsiella* spp.

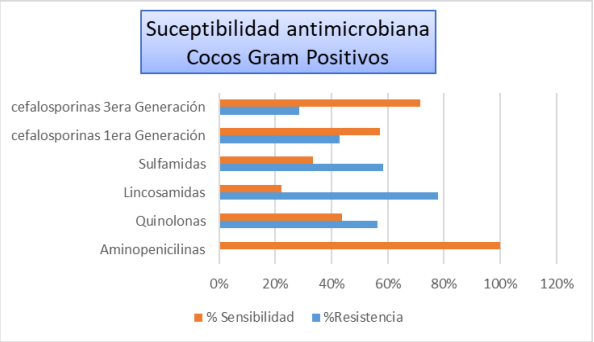


Gráfico 2: Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus, Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp

Discusión

Las piodermias son las patologías dermatológicas más frecuentes en la consulta veterinaria. En este estudio el grupo *Staphylococcus* spp fue el agente más aislado (50%) en infecciones de piel de caninos. Teniendo en cuenta los antibióticos más usados en la clínica médica veterinaria, en el caso de las bacterias Gram negativas solo se observó sensibilidad a las quinolonas, presentando resistencia a aminopenicilinas (100%) y sulfonamidas (80%) ampliamente usadas en el tratamiento empírico. Con respecto a ésta última, los cocos Gram positivos también presentaron 58% de resistencia acompañando al grupo de lincosamidas (78%), y quinolonas (56%) también utilizadas con frecuencia en el tratamiento de piodermias superficiales y complicadas. Se observó menos del 50 % de resistencia a las cefalosporinas y 100% de sensibilidad a las aminopenicilinas. Estos resultados remarcan la necesidad de realizar en la clínica diaria toma de muestras, coloraciones y estudios de susceptibilidad antimicrobiana, antes de realizar un tratamiento empírico. Por otro lado realizando el fenotipo de resistencia podemos detectar aislamientos de *Staphylococcus* spp meticilino resistentes, o sea, resistentes a todos los antibióticos betalactámicos. Este trabajo contribuye a la vigilancia de la resistencia bacteriana en cepas bacterianas de origen clínico en veterinaria y alerta sobre la necesidad de implementar medidas que contribuyan al uso racional de los antimicrobianos.

Bibliografía

- Cowan ST, Feltham, RK, Steel, KJ, Barrow, GI. (2006). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria.Ed Cambridge University Press.
- Nelson, R; Couto, G. (2010). Medicina Interna de pequeños animales
-Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standards, Fourth Edition, VET 01-A4.
Agradecimientos: a los alumnos del LEEI que procesaron las muestras.

EPIDEMIOLOGÍA

E1- RELEVAMIENTO DE ENFERMEDADES VENÉREAS EN PEQUEÑOS Y MEDIANOS PRODUCTORES DE LA COSTA DEL RÍO URUGUAY

D. F. Benitez[1]; C.G. Sosa[1]
[1] Estación Experimental INTA Mercedes, Corrientes
benitez.daniel@inta.gob.ar

Introducción

Las enfermedades venéreas de los bovinos son aquellas que producen pérdidas en la reproducción y pueden ser transmitidas en el momento de coito. Entre las más importantes se pueden citar *Tricomonosis bovina y Campyilobacteriosis bovina*. La **Tricomonosis bovina** es una enfermedad producida por una agente llamado *Tritrichomona foetus*, que se transmite en forma venérea, siendo el único síntoma esencial en la hembra la infertilidad temporaria. Por otro lado, la **Campylobacterosis o Vibriosis bovina,** es una enfermedad causada por *Campylobacter fetus*, el cual se ubica en el tracto genital tanto del macho como en la hembra y es trasmitido en forma venérea. En ambos casos el macho se comporta como portador pasivo y de por vida de la infección.

En la provincia de Corrientes, se reportaron un 2,2% de fetos positivos a *Campylobacter fetus*, en un estudio realizado por Draghi, et al 2002. Por otro lado Baez Köhn en 1981 que encontró el 14,58% de los rodeos infectados con *T. foetus* y el 6,25% con *Campylobacter fetus.*

Es muy importante la atención sanitaria a pequeños y medianos productores puesto que no es habitual que realicen los exámenes en toro. Además, en muchos casos se dificulta estos análisis por las distancias con respecto a los Laboratorios de diagnóstico o por la falta de un asesoramiento veterinario. El objetivo de este trabajo fue analizar la importancia de la casuística de las enfermedades de trasmisión sexual en los departamentos ubicados en la costa del Río Uruguay en la provincia de Corrientes.

Materiales y métodos

El trabajo de muestreo a través de la técnica de raspados de toros, se llevó a cabo en los departamentos de Santo Tomé, Paso de los Libres, Monte Caseros y Mercedes.

Ciudad	Muestra	Nº Eto.	Etos pos. a T. foetus	Etos pos a C. fetus	Toros positivos T foetus	Toros positivos C. fetus
Mercedes	36	9	0	0	0	0
Santo Tome	302	26	0	0	0	0
Paso de los Libres	470	11	0	2	0	7
Monte Caseros	54	9	0	0	0	0

Cuadro N 1: Resultado del relevamiento de las enfermedades venéreas en toros

Se contó con el apoyo de asesores de Cambio Rural trabajando con grupos de medianos y pequeños productores en el ámbito del PRET Norte. En todos los casos el Laboratorio de Sanidad Animal les proveía de los medios de transporte y de cultivo. Luego las muestras eran remitidas al laboratorio para su procesamiento.

En el Laboratorio se utilizó la técnica de Inmunofluerescencia directa para Campylobacter y Cultivo en medio de caldo Infusión de hígado para el caso de Tricomonas. En todos los casos de realizó un solo raspado prepucial.

Resultados y discusión

En el periodo 2012-2018 se procesaron 862 muestras para diagnóstico de Campylobacter spp (433) y Tricomonas spp (429). Se ha tenido acceso a alrededor de 56 establecimientos con bovinos. En muchos casos con ganadería de subsistencia, que contaba con un solo toro y en otros casos con un manejo más ordenado de la hacienda, con servicio estacionado de primavera inclusive.

Como podemos observar en el cuadro N 1, solo en Paso de los Libres se pudo diagnosticar la presencia de *Campylobacter fetus*, a través de la técnica de IFD. Lo cual indica la presencia de esta enfermedad en rodeos de esta región. En ambos casos se recomendó que los animales fueran retirados del establecimiento y en lo posible fuera reemplazado por uno sano. Además se pudo determinar que el 3,6 % de los establecimientos muestreados presentan problemas de enfermedades venéreas. Y el 1,6 % de los toros analizados para diagnóstico de Campylobacter resultaron positivos a esta enfermedad.

Conclusión

El control de las enfermedades venéreas en rodeos ganaderos de la región, es de suma importancia para mejorar los índices productivos. En estratos de productores con una ganadería comercial o de subsistencia (pequeños productores) las pérdidas de preñez impactan en su economía. Si a esto le sumamos que en su gran mayoría no cuentan con asesoramiento técnico profesional, es sumamente importante conocer la situación sanitaria en la que se encuentran. Al proponer la actividad de trabajo con los pequeños y medianos productores que están en relación a las agencias de extensión del INTA, se esperaba encontrar un mayor porcentaje de animales positivos, especialmente a Tricomonas. Por el contrario solo se encontraron dos establecimientos con animales positivos a Campylobacter spp.

Bibliografía

-Stoessel F. Enfermedades venéreas de los bovino: Trichomoniasis y vibriosis genital, 1982. Editorial Acribia, España.

-Baez Kohn, A.R. Relevamiento de Tricomonas foetus y Campylobacter (Vibrio) fetus en la provincia de Corrientes, Argentina. 1981 Rev. De Investigaciones Agropecuarias INTA 2: 253-262.

-Draghi, M.G.; Cetrá, B.; Alcaraz, E.L.; Ramírez, J.C., Ramírez, L.M. Sosa C.G., Biotti, G.M:, Pereira, M. Duffy, Sergio. Estudio de las enfermedades infecciosas que influyen en la fertilidad de los toros. XV Reunión de la AAVLD, Villa General Belgrano, Córdoba 13 al 15 de noviembre de 2002.

E2- ESTUDIO DE LOS DIAGNÓSTICOS DE BRUCELOSIS BOVINA REALIZADOS DURANTE EL PERIODO 2015 - 2016 EN LA CUENCA LECHERA DE TRANCAS, TUCUMÁN, ARGENTINA

J. Araoz[1], L. Cruz, A. de la Vega, F. González del Pino

Introducción

La brucelosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial y de curso crónico, que ocasiona importantes trastornos reproductivos limitantes del desarrollo ganadero, además constituye una zoonosis. Según datos de la FAO Argentina se encuentra entre los primeros 20 productores de leche de vaca en el mundo, con un total de 11.796.000 toneladas por año (Cisint, 2004). Las principales regiones productoras se localizan en la región central del país. Una de las cuencas extra pampeanas más importantes a nivel nacional es la de Trancas, Tucumán. A pesar de no tener un gran volumen de contribución al total del stock (cerca del 1%) representa una actividad económica y social importante para esa provincia, por ser generadora de fuente de trabajo genuina e intensiva, manteniendo a las familias arraigadas en esa región rural (Cisint, 2004).

Diferentes trabajos se han desarrollado para observar la prevalencia de esta enfermedad en explotaciones lecheras; esta información permite, entre otras, tomar medidas sanitarias adecuadas para la lucha contra esta patología.

Según un relevamiento realizado por la Municipalidad de Trancas en 2016, existen 42 establecimientos con límites definidos que totalizan 7.462 cabezas de ganado.

En el año 2000 Cruz y col. estudiaron la incidencia de la brucelosis bovina en pequeños productores tamberos del área productora de leche de la provincia de Tucumán, sangrándose el 20% de los establecimientos. Los autores encontraron una prevalencia de 5,57 %.

En el año 2006, el programa de Brucelosis la Dirección Nacional de Sanidad Animal realizó un muestreo de cobertura nacional, con el propósito de determinar la prevalencia de la enfermedad por región. Tucumán integraba la zona NOA-Cuyo, conformada además por las provincias de Salta, Jujuy, Catamarca, La Rioja, San Juan y Mendoza. En esta zona se estableció una prevalencia intrapredial del 10 %, incluyendo en la muestra 459 predios y 4.590 muestras bovinas.

Andrada y col. en el 2015 describieron que en la cuenca de Trancas la prevalencia de la enfermedad para el año 2013 fue del 1%, mientras que para el año siguiente esta se vio incrementada en más de dos puntos porcentuales llegando a valores cercanos al 4%.

No se encontraron datos actualizados que describan la prevalencia de la enfermedad en la cuenca lechera de la provincia de Tucumán.

El objetivo de este trabajo es describir, durante el periodo comprendido entre los años 2015 y 2016, los diagnósticos realizados de brucelosis bovina en la cuenca de Trancas, provincia de Tucumán, en términos de cantidad de establecimientos analizados y prevalencia de la enfermedad encontrada.

Materiales y métodos

A partir del banco de datos del único laboratorio de diagnóstico de brucelosis animal de la provincia de Tucumán, LABRYDEA (perteneciente a la Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, integrante de la red oficial del SENASA) se realizó una descripción cuali-cuantitativa de los diagnósticos de brucelosis bovina provenientes de tambos de la mencionada cuenca en el período comprendido entre los años 2015-2016.

El trabajo se desarrolló en 2 etapas: organización del sistema de información y análisis cuantitativo de los diagnósticos de brucelosis bovina realizados por año y por establecimientos lecheros. Respecto a la organización del sistema de información, en primer término, se cargaron y sistematizaron los datos contenidos en los protocolos oficiales del SENASA, que acompañan a las muestras serológicas remitidas para el diagnóstico de la enfermedad por veterinarios acreditados por ese mismo organismo oficial, quienes trabajan en establecimientos privados y/o de gestión estatal con pequeños productores. En ellos se describen, entre otros datos, número de animales por establecimiento y lugar de origen.

Una muestra se define como un diagnóstico serológico individual de un animal perteneciente a un establecimiento y localizado en un departamento determinado de la provincia.

Se utilizaron las técnicas oficiales de diagnóstico: Antígeno Buferado en Placa (BPA) como prueba tamiz y Seroaglutinación lenta en tubo (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2-ME) como técnicas confirmatorias, descriptas en el Manual de Procedimientos para diagnóstico de Brucelosis, publicado por la Dirección de Laboratorios y Control Técnico (1998).

Para el análisis descriptivo estadístico se utilizaron herramientas de estadística descriptiva básica, tales como razones, proporciones y promedios.

Recordemos que la prevalencia se calcula como la ratio entre la población afectada con relación a la población total.

Resultados y discusión

Durante el año 2015, se determinó una prevalencia del 6 %, mientras que para el 2016 la prevalencia fue del 1 %. En ambos periodos todos los animales positivos al diagnóstico de brucelosis pertenecieron al mismo predio en estudio (Tabla 1)

Tabla 1: Presencia de brucelosis en la Cuenca de Trancas.

Resultado de los diagnósticos de brucelosis bovina en la Cuenca de Trancas		
	Año 2015	Año 2016
Total de animales muestreados	771	2670
Total de animales positivos	44	8
Prevalencia	6%	1%
Total de predios analizados	15	15
Prevalencia Intrapredio	18%	4%

Según un relevamiento realizado por la Municipalidad de Trancas en 2016, existen 42 establecimientos con límites definidos. Durante el periodo analizado se recibieron muestras del 36 % de los mismos.

De acuerdo con Cruz (2000) y Andrada (2015), la prevalencia en la cuenca de Trancas en el año 2000 se ubicó en torno al 5,57%, mostrando un marcado descenso en el año 2013, momento en el que alcanzó valores cercanos al 1%. En el año 2014 la prevalencia comienza a aumentar, pasando de un 3,7% (Andrada, 2015) a un 6% en 2015, de acuerdo con estimaciones propias. Sin embargo, en este punto no es posible hablar de una tendencia creciente, puesto que en el año 2016 los niveles de prevalencia caen nuevamente a niveles por debajo del 1%.

Conclusión

Si bien los resultados arrojan que la enfermedad está presente en la cuenca lechera, solo un establecimiento del total analizado evidencia signos de la presencia de la enfermedad.

Bibliografía

-Andrada L.E. col. y (2015) Descripción de los diagnósticos de Brucelosis bovina realizados durante el periodo 2013 a 2014 en la cuenca lechera de Tapia-Trancas, Tucumán, Argentina. 3° Reu. Conj. de Soc. de Biología de la R.A. Tucumán, sept. 2015.

-Cisint, J.C. y col. (2004). Caracterización general de la cuenca lechera de trancas, Tucumán, Argentina. Rev. Extensión FAZ de la Universidad Nacional de Tucumán, 2: 1-15.

-Cruz M.L. y col. (2000). Prevalencia de la brucelosis bovina en pequeñas explotaciones lecheras de la cuenca Tapia-Tranca, de la provincia de Tucumán, Argentina. Vet. Arg. XVII (162). Pag.: 93-97.

E3- APLICACIÓN DE UN MODELO BAYESIANO PARA ESTIMAR LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y PREVALENCIA DE TRES PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS PORCINA, SIN PRUEBA DE REFERENCIA

A.R. Bence[1,5]; S.E. Gutiérrez[2,4]; M. Risso[3]; S. M. Estein[1,4]
[1] Laboratorio de Inmunología [2] Laboratorio de Virología. CIVETAN. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Pinto 399. Tandil (7000). [3]Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. [4]CONICET. [5]CICPBA.
arbence@vet.unicen.edu.ar

Introducción

El diagnóstico de la brucelosis porcina se basa en la observación de los signos clínicos asociados a la serología y/o cultivo bacteriológico positivo. No existe una prueba serológica de referencia y ninguna de las disponibles ha demostrado ser confiable para el diagnóstico individual. Aunque estas pruebas son aplicables a un gran número de muestras, no han sido debidamente estandarizadas para la especie porcina. Si bien el aislamiento de Brucella suis constituye la Prueba de Referencia (PR), no siempre es posible. Existe escasa información sobre los valores de sensibilidad (S) y especificidad (E) de las pruebas serológicas utilizadas; y sólo hay reportes de relevamientos parciales pero no de prevalencia (Prev) de la enfermedad (aproximadamente del 18 % (Castro et al., 2006). En este contexto, mediante la utilización de un modelo Bayesiano es posible determinar las probabilidades posteriores de validación diagnóstica siguientes: Valor Predictivo Positivo (VPP), Falso Negativo (FN), Valor Predictivo Negativo (VPN), Falso Positivo (FP) y Prevalencia basado en datos obtenidos de trabajos previos. El objetivo de este trabajo fue estimar la S, E y Prevalencia de las pruebas: Aglutinación en placa con antígeno tamponado (BPA), Test de Rosa de Bengala (RBT) y Polarización de la Fluorescencia (FPA), para la detección de brucelosis porcina, mediante la implementación de un modelo bayesiano en ausencia de PR.

Material y métodos

Se analizaron mediante las pruebas de BPA, RBT y FPA 545 muestras de sueros porcinos de distintas categorías y provenientes de 3 establecimientos (Pcia. de Bs. As). La ejecución e interpretación de las pruebas se realizó de acuerdo a la normativa establecida por SENASA. Se estimaron valores de S y E sin PR a través de información aportada por *prior* informativas (PI) (Praud et al., 2012). Partiendo de una Distribución Beta (DB), se desarrolló un modelo en WinBUGS (WB), utilizando la comunicación con lenguaje R (R2WinBUGS). Desde un conteo de resultados Positivos y Negativos de las muestras analizadas, se utilizaron parámetros de S, E y Prev, obtenidos de la bibliografía. Se utilizó la instrucción epi.betabuster {epiR}, en lenguaje R, para estimar las probabilidades posteriores mencionadas y al mismo tiempo, estimar la Prev. En WB, se usaron 10000 iteraciones del modelo, y se descartaron las primeras 1000. Se expresó la distribución posterior de probabilidad, como media posterior (mp), desvío estándar posterior (dep) e intervalo de credibilidad Bayesiano (ICB) del 95% para cada muestra. Para validar las pruebas y luego, comparar valores obtenidos entre las mismas, se utilizó una prueba de diferencia de proporciones Bayesiana.

Resultados

Resultados de la pruebas serológicas

PRUEBA	POSITIVOS	NEGATIVOS
BPA	83	462
RBT	50	495
FPA	111	434

Análisis estadístico Bayesiano

Prueba	Variable	mp ± dep	ICB
BPA	**S**	0,8609± 0,0355	0,7863-0,9225
	E	0,9608± 0,0184	0,9182-0,9887
	Prev	0,1390±0,0275	0,08120-0,1906
	Valor *p*	*< 0,003*	
RBT	**S**	0,7504 ±0,1013	0,5253-0,9164
	E	0,9060 ±0,0136	0,8791-0,9329
	Prev	0,0181 ±0,0159	0,0006-0,0590
	Valor *p*	*< 0,05*	
FPA	**S**	0,8496 ±0,0660	0,6797-0,9374
	E	0,9575 ±0,0218	0,8968-0,981
	Prev	0,1968 ±0,0374	0,1231-0,2717
	Valor *p*	*< 0,0002*	

Discusión y conclusión

A partir de los resultados obtenidos, se infiere:
-La S y E diagnóstica de BPA y FPA fueron superiores a la del RBT.
-En las tres pruebas hay asociación significativa entre enfermedad y resultados positivos, lo cual valida las mismas.
-Sólo los resultados de BPA y FPA arrojan valores de prevalencia similares a los reportados en Argentina.
-La perspectiva Bayesiana permitió estimar parámetros de S, E y Prev, en ausencia de una PR.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Laboratorio Biotandil SRL los antígenos cedidos y la realización de la prueba de FPA en tubo.

Bibliografía

-*Castro et al.2006.Rev Arg Microbiol 38:75-78.-Ntzoufras I. 2009. Bayesian modeling using WinBUGS, John Wiley. -Risso MA y Risso P.2017.Introducción a la estadística bayesiana: uso de lenguaje R y Winbugs, 1ª Ed., Vuelta a Casa La Plata, Arg.1:144.-Nicola AM et al.2009.Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. SENASA. -Praud et al.2012. Prev Med 104:94-100.*

E4-ENFERMEDADES VENÉREAS EN TOROS: PREVALENCIA EN EL SUDOESTE DE LA REGIÓN PAMPEANA 2000-2017

I. Alvarez[1*], C. Quartucci[1], E. Schmale[1], L. González[1], F. Moreno[2], J. Passucci[3], G. Cantón[4]
[1] Laboratorio ALVAREZ, Bahía Blanca. [2] INTA Tandil. [3] Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), CONICET, UNCPBA.[4] INTA EEA Balcarce. ignacio@labalvarez.com.ar

Introducción

El avance de la agricultura en la Pampa Húmeda llevó a la expansión de la ganadería a zonas consideradas tradicionalmente marginales como el Sudoeste Bonaerense, norte de Rio Negro y sur de La Pampa, caracterizadas por una menor calidad de suelos, escasas precipitaciones y menor aplicación de tecnología. Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) más importantes de los bovinos son la Tricomonosis bovina y la Campylobacteriosis genital bovina. Estas 2 enfermedades se distribuyen en la mayoría de los sistemas ganaderos del mundo donde se utiliza preponderantemente servicio natural. Los porcentajes de preñez pueden reducirse entre un 15% a un 25% según se encuentren solas o asociadas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la casuística de las ETS diagnosticadas en toros de la región semiárida pampeana por un laboratorio de diagnóstico veterinario privado en el periodo 2000-2017.

Materiales y métodos

Se analizaron los resultados obtenidos de muestras de fluido prepucial de toros de establecimientos ganaderos para realizar el diagnóstico de ETS en el periodo 2000-2017 en el laboratorio ALVAREZ, ubicado en la ciudad de Bahía Blanca. Las muestras de fluido prepucial habían sido obtenidas mediante el raspador de cepillo, pipeta de IA o lavado prepucial por veterinarios de la actividad privada. Para el diagnóstico de *Campylobacter fetus* el fluido prepucial se depositó directamente en solución salina formolada al 1% y se utilizó la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) con un anticuerpo comercial. Para realizar el diagnóstico de *Tritrichomonas foetus*, la muestra de fluido prepucial se sembró en forma directa en el medio de transporte y cultivo especifico elaborado por el laboratorio. Los medios se incubaron en estufa a 37°C, en oscuridad y durante 7 días consecutivos se examinaron bajo microscopio óptico. Al considerarse el cultivo positivo, los protozoos se identificaron por sus características morfológicas y de motilidad.

Los establecimientos con al menos un toro positivo a *T. foetus* y/o *C. fetus* se clasificaron como positivos. Se calcularon las tasas de positividad de las ETS para el total de toros para el periodo de estudio. Se estimó una regresión cuadrática para cada enfermedad y para el porcentaje de animales y establecimientos positivos.

Resultados

En el periodo de estudio se analizaron 280.457 muestras. En promedio se realizaron 1,4 raspajes/toro/año(con mínimos de 1,33 para el 2004 y máximos de 1,46 para el 2014). Las tasas de positividad por establecimiento para ambas enfermedades, en los primeros años de estudio alcanzaban cifras altas (alrededor del 20%), para ir descendiendo y estabilizándose hacia los años 2009-2010, con valores cercanos al 5% (Gráfico 1).

La tasa de positividad individual para Tricomonosis alcanzó valores máximos entre los años 2000 y 2001 (casi el 5% de los toros analizados), mientras que para Campylobacteriosis oscilaron entre el 2 y el 3% para los mismos años. Dichas tasas disminuyeron al trascurrir los años, siendo en el caso de la Tricomonosis, dicho descenso más marcado (Gráfico 2).

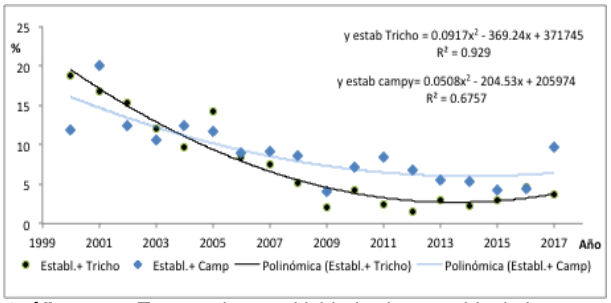


Gráfico 1: Tasas de positividad de establecimientos ganaderos a ETS.

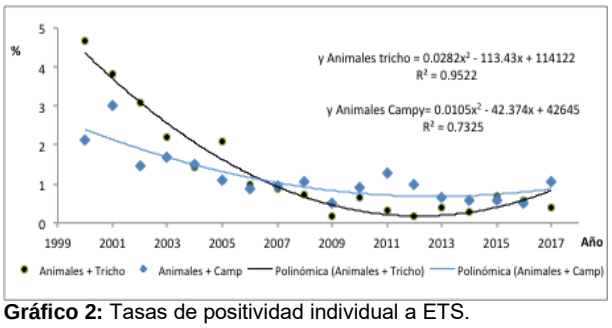


Gráfico 2: Tasas de positividad individual a ETS.

Discusión y conclusión

Estos resultados pueden ser tomados como referencia para estimar la prevalencia de las ETS en esta zona ganadera del país, debido a la escasa información sobre enfermedades reproductivas en dicha región.

El trabajo que año a año realizaron los veterinarios rurales en sus establecimientos para sanear los rodeos, fue fundamental para lograr la disminución observada en las tasas de positividad.

La región semiárida ha pasado por diferentes situaciones climáticas y económicas durante los años analizados, lo que provoco que los productores vayan adaptando la carga de animales por hectárea para equilibrar la disponibilidad de los recursos forrajeros, ya sea reduciendo o abandonando temporalmente la actividad de reproducción. Esta reducción del rodeo probablemente haya favorecido en gran medida a la disminución en las tasas de positividad. La liquidación de categorías susceptibles a padecer la enfermedad como los toros de mayor edad del rodeo puedo haber contribuido a esta reducción. Para el caso de las hembras, las prolongadas sequías citadas llevaron a retrasar el comienzo de los servicios, prolongando así el período de descanso y posiblemente impidiendo la reinfección de los toros y permitiendo que las vacas positivas se liberen de la infección. El promedio de muestreos realizados por animal, fue menor al mínimo recomendado por la AAVLD. Es necesario aumentar el número de muestreos con el objetivo de mejorar la sensibilidad de las técnicas utilizadas y disminuir la permanencia de animales infectados en el rodeo. En el futuro, la implementación de técnicas moleculares en muestras de campo, que ya se han comenzado a evaluar en este laboratorio, podrían contribuir en gran medida a mejorar las tasas de detección y reducción de las ETS.

Bibliografía

-Campero. 2002. Rev. Idia 21(2): 127-131
-Rae et al. 2004. Theriogenology 61(4):605-618.
-Mendoza-Ibarra et al. 2012. The Vet. Journal 193:146-151
AAVLD 1992. Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Campylobacteriosis y Tricomoniasis genital bovina.

E5- VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA EN ARGENTINA. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PERÍODO 2010-2016

F. Delgado[1], MS. Maloberti[2], A. Elisei[1], R. Balzano[2], G. Jauregui[1], J. Re[1], G. Pinto[1], M. Cippitelli[1], L. Dassa[2], A. Facchini[1], A. Raia[1], C. Moreno[1], G. Francinelli[1], MC. Sanchez[1], F. Balbiani [1], F. Ghigliazza[1], R. Sanguinetti[2], F.J. Blanco Viera[1]
[1]Lab. Nacional de Referencia para las EET, CICVyA, INTA; [2]Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.
delgado.fernando@inta.gob.ar

Introducción

La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) es una enfermedad degenerativa del sistema nervioso central. Afecta a bovinos, otras especies animales y al ser humano. El agente causal, denominado Prion, se transmite a través del consumo de alimentos contaminados con materiales de riesgo, como son el sistema nervioso central, ojos y ciertas organizaciones linfoideas.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) exige la realización de un programa de vigilancia epidemiológica para otorgar un estatus oficial a los países solicitantes. El mismo requiere el monitoreo de bovinos adultos de diferente edad pertenecientes a 4 subpoblaciones especificas (cuadro 1). Cada muestra otorga un puntaje determinado, exigiéndose un mínimo de puntos que debe alcanzarse en un período de 7 años. De acuerdo a la situación epidemiológica de EEB y a su población bovina, la Argentina debe alcanzar 150.000 puntos en este período. El objetivo del presente trabajo fue detectar EEB a una prevalencia de 1 caso por cada 50.000 bovinos adultos de la República Argentina, en el período 2010-2016.

Materiales y Métodos

En el marco del "Programa Nacional de Prevención y Vigilancia para las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles de los animales", se realizó un muestreo en campo y frigorífico involucrando animales de las subpoblaciones de mayor interés. Para el diagnóstico de EEB se utilizaron pruebas de Western blot y/o Inmunohistoquímica. Para el primero se utilizó un producto comercial (Prionics Check-Western kit), mientras el segundo se realizó siguiendo procedimientos desarrollados en el laboratorio. El cálculo de puntos obtenidos se realizó de acuerdo a los lineamientos establecidos por la OIE.

Resultados

Todos los bovinos analizados resultaron negativos a EEB. El puntaje obtenido para cada categoría se resume en el cuadro 1.

Discusión y conclusiones

El puntaje alcanzado supera ampliamente el solicitado por la OIE de 150,000. Los resultados obtenidos indican que la probabilidad de que el agente de la EEB esté presente en animales de la República Argentina es muy baja. Este hecho, en conjunto con otras acciones implementadas por la autoridad sanitaria, permitieron alcanzar la categoría de "riesgo insignificante de EEB", asegurando la inocuidad de los productos de origen bovino respecto de esta enfermedad. Resulta importante continuar las acciones tendientes a sostener tal condición sanitaria, a fin de preservar la salud pública y favorecer el comercio de productos de origen bovino.

Referencias

-Organización Mundial de Sanidad Animal. París, Francia. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Capítulo 11.4. Encefalopatía Espongiforme Bovina. Acceso el 26/04/2018. Disponible en http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_bse.htm

-Organización Mundial de Sanidad Animal. París, Francia. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Capítulo 2.4.5. Acceso el 26/04/2018. Disponible en http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.05_BSE.pdf

Cuadro 1. Resumen de animales analizados y puntos obtenidos. Período 2010-2016

Subpoblaciones sometidas a vigilancia								
	Sacrificio de rutina		Animales hallados muertos		Sacrificio de emergencia		Casos de sospecha clínica	
	Muestras	Puntos	Muestras	Puntos	Muestras	Puntos	Muestras	Puntos
≥2 y <4 años	0	0,1	842	0,2	1557	0,4	63	260
≥4 y <7 años	0	0,2	1811	0,9	5338	1,6	258	750
≥7 y <9 años	0	0,1	1285	0,4	3625	0,7	109	220
≥9 años	0	0	240	0,1	527	0,2	32	45
Subtotales	0		4178		11047		462	
Puntos subtotales	0		2336,3		11806,5		235300	

Total de animales: 15.687 Total puntos: 249.442,8

E6- CASUÍSTICA DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS BOVINAS CONFIRMADAS MEDIANTE PCR EN UN LABORATORIO DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA DURANTE LOS AÑOS 2016 Y 2017

J. Giraudo[1,2]; N. Moiso[1,2] ; G. Di Cola[1,2], N. Troti[1,2], D. Lando[1].
Laboratorio de Salud Animal (LASA), Juan B. Justo 269, Río Cuarto, Córdoba 5800
Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Departamento de Patología Animal. CP 5800 e-mail: jgiraudo@ayv.unrc.edu.com

Introducción

El complejo Respiratorio Bovino (CRB) es causado por múltiples fuentes, ocasionando pérdidas productivas en los sistemas de recría y engorde. Las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad son atribuidas a la muerte por neumonía, menor eficiencia en la producción y los costos. Para el control efectivo de esta enfermedad, además de todos los factores de riesgo ya conocidos se considera un aporte fundamental la identificación con certeza del o los agentes etiológicos, puesto que esto permite optimizar terapéutica y plan sanitario (vacunas). A continuación se presenta la casuística respiratoria recibida durante los años 2016 y 2017 en el Laboratorio de Salud Animal. El objetivo es un correcto diagnóstico e identificación del agente sumando a las pruebas convencionales la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Materiales y métodos

El material consistió en las muestras receptadas en el período descripto, un total de 101 casos (57 durante el año 2016 y 44 durante el año 2017). Las pruebas diagnósticas utilizadas fueron: bacterioscopía, bacteriología, histopatología, inmunofluorescencia, aislamiento viral y PCR. La PCR se realizó sobre los cultivos primarios y muestras clínicas. Cada PCR se realizó bajo las condiciones descriptas por los autores citados.

Resultados

Del total de aislamientos de Pasteurella spp, fueron clasificadas mediante PCR como P. multocida 63 cepas, de las cuales se confirmaron a través de serotipo capsular como P. multocida Tipo A 41 cepas y P. multocida Tipo D 22 cepas. Las 6 cepas presuntas de Histophilus spp como las 5 cepas presumibles de Mannheimia spp, fueron clasificas como H. somni y M. haemolytica respectivamente por la PCR de especie específica.

Las 6 muestras clasificadas como neumonías granulomatosas por lesiones macroscópicas como microscópicas a la histopatología fueron Ziehl Neelsen positivas. 12 muestras clasificadas como neumonía enfisematosa por lesiones macroscópicas y microscópicas mediante histopatología, fueron caracterizadas en su mayoría como Neumonía Intersticial Atípica y las restantes sin diagnóstico etiológico. De las 5 muestras con edema pulmonar por lesiones macroscópicas y microscópicas por histopatología, 4 fueron compatibles con Intoxicación por Monensina y la restante sin diagnóstico.

Discusión

En el presente trabajo se demuestra la importancia de la PCR para la confirmación de aislamientos primarios y muestras clínicas, que, por las características de cultivo, morfología, tanto de la colonia como a la tinción y pruebas bioquímicas eran coincidentes con los agentes patógenos habitualmente encontrados en patologías respiratorias. La patogenicidad de los microorganismos causantes del CRB, se encuentra directamente relacionada a ciertos biotipos de estos agentes, siendo esto importante de determinar, mediante biología molecular, a la hora de la selección de cepas para la elaboración de vacunas. La PCR permite diferenciar agentes etiológicos y sus biotipos, indistinguibles en cultivo.

Bibliografía

- Sebastian Guenther, Peter Schierack, Mirjam Grobbel, Antina Lübke-Becker, Lothar H. Wieler, Christa Ewers (2008). Real-time PCR assay for the detection of species of the genus Mannheimia. Journal of Microbiological Methods 75 (2008) 75–80.
- TOWNSEND, K. M., A. J. FROST, C. W. LEE, J. M. PAPADIMITRIOU, AND H. J. DAWKINS. (1998). Development of PCR assays for species-and type-specific identification of Pasteurella multocida isolates. J. Clin. Microbiol. 36:1096–1100.
- TOWNSEND, K. M., BOYCE, J. D., CHUNG, J. Y., FROST, A. J. AND ADLER, B. (2001). Genetic organization of Pasteurella multocida cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. J. Clin. Microbiol. 39: 924–929.
- Øystein Angen , Peter Ahrens, Conny Tegtmeier. Development of a PCR test for identification of Haemophilus somnus in pure and mixed cultures. Veterinary Microbiology 63 (1998) 39±48.

E7- LEPTOSPIROSIS BOVINA: CASUISTICA DE MORTANDAD DE TERNEROS DIAGNOSTICADA EN EL INTA BALCARCE (2000-2017)

G. Cantón[1*], F. Cheuquepán[1], J. Acuña[1], I. Llada[1], E. Morrell[1], E. Odriozola[1].
[1]INTA, EEA Balcarce.
*canton.german@inta.gob.ar

Introducción

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica que genera grandes pérdidas económicas en la producción bovina a nivel mundial. En Argentina, la prevalencia serológica en bovinos es alta (Seijo y col., 2002). Clínicamente en el bovino se manifiesta más frecuentemente con pérdidas reproductivas (infertilidad, abortos y muerte perinatal) y mermas en la producción de leche. Además, es frecuente que provoque mortandad de bovinos jóvenes y muy raramente en adultos. El objetivo de este trabajo es realizar un análisis retrospectivo de mortandades en bovinos por Leptospirosis, registrados en el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) del INTA Balcarce, entre el año 2000 y 2017.

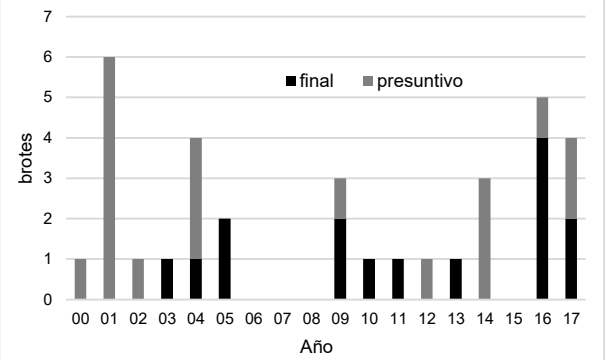
Materiales y métodos

Se analizó retrospectivamente el registro de protocolos ingresados desde el año 2000 al 2017, evaluando información anamnésica disponible: sistema de producción, categoría animal afectada, factores predisponentes, entre otros. Se arribó a un diagnóstico presuntivo cuando se describieron hallazgos clínico-patológicos (necropsia e histopatología) compatibles con la enfermedad. Se arribó a un diagnóstico definitivo, cuando además, se confirmó la presencia de *Leptospira* spp mediante inmunofluorescencia directa (IFD) sobre improntas de tejidos, utilizando un conjugado multivalente (LEP-FAC, National Veterinary Services Laboratories, USDA).

Resultados

Desde el 2000 al 2017, se registraron 34 brotes de mortandad de terneros por Leptospirosis en el SDVE, ocurridos en las provincias de Buenos Aires (30), La Pampa (1), Santa Fe (1) y Río Negro (1). De estos brotes, en 15 (44,1% de los brotes) se confirmó el diagnóstico mediante IFD, mientras que en los 19 restantes (55,9%), se emitió un diagnóstico presuntivo. El registro de los brotes se muestra en el Gráfico 1. No se detectó una estacionalidad en las mortandades registradas en los sistemas de producción de leche, mientras que en los de carne, se observó un pico de casos registrados en el mes de junio. Los brotes se diagnosticaron en sistemas de producción de carne (21) y leche (11). En los sistemas de carne, las mortandades ocurrieron en terneros al pie de la madre (11), en sistemas de engorde a corral (4) o pastoril (4). En los sistemas de producción de leche, las muertes ocurrieron en la guachera (3) o en la recría (8). La edad promedio (± desvío estándar) de los terneros afectados en sistemas de carne era de 4,6 ± 4,0 meses mientras que en los de leche era de 4,7 ± 2,7 meses. La mortalidad promedio registrada en los sistemas de producción de carne fue del 2,38% mientras que en los sistemas de leche fue del 6,50%. Como hallazgo de necropsia se mencionó más frecuentemente la ictericia (77,8%), hematuria (5,6%) y anemia (2,2%). Como hallazgos histopatológicos las lesiones más frecuentes fueron nefritis intersticial no supurativa (87,5%), hepatitis periportal no supurativa (75,0%), neumonía intersticial no supurativa (37,5%), además de esplenitis necrotizante y meningitis no supurativa (12,5%). En solo 4 de los brotes, se mencionó que previamente se habían aplicado vacunación a estos terneros, mientras que en el resto no se registró esa información. En 3 brotes, se mencionó la ocurrencia de abortos previamente.

Gráfico 1: Casuística anual de diagnósticos definitivos y presuntivos de mortandad de terneros por Leptospirosis registradas por INTA Balcarce.



Discusión y conclusión

La Leptospirosis es una causa frecuente de mortandad en animales jóvenes. Este trabajo demuestra la casuística de mortandad en terneros registrada por el SDVE y se ve una coincidencia con la casuística de abortos registradas por el mismo agente (Cantón et al., 2014). En el año 2003 se empezó a implementar la técnica de IFD para el diagnóstico de la Leptospirosis (Morrell 2010), lo que permitió confirmar muchos de los diagnósticos presuntivos que se emitían hasta ese momento. Sin embargo, se siguieron registrando episodios en los que la técnica no fue efectiva para su diagnóstico, lo que demostraría su baja sensibilidad. En muchos de estos casos, se descartaron otras causas frecuentes con características clínico-patológicas compatibles con *Leptospira* spp. La enfermedad fue diagnosticada con frecuencia similar en sistemas de producción de leche o de carne y, con la excepción de un brote, en animales de menos de 1 año de vida. No se observaron diferencias en las edades de los terneros afectados en ambos sistemas, aunque, la mortandad en los sistemas de producción de leche, pareciera ser más alta que en los de carne. Esto podría estar relacionado a las características del sistema productivo, siendo quizás, las tasas de contacto más altas, lo que predispondría a una mayor incidencia de la enfermedad.

Esta enfermedad sigue causando graves pérdidas económicas en nuestros sistemas, siendo además una zoonosis muy distribuida mundialmente. Si bien solo se registró que algunos animales habían sido vacunados, se debe hacer hincapié en la importancia de la aplicación de planes de inmunización para disminuir su incidencia teniendo en cuenta aspectos de salud animal y pública.

Bibliografía

-Cantón et al. 2014. XX Reunión Científico Técnica de la AAVLD.
-Morrell 2010. Tesis doctoral, UNLP.

E8- NEOSPOROSIS: SEROPREVALENCIA EN TAMBOS BOVINOS DE LA PROVINCIA DE SAN LUIS

M. G. Delgado[1], E. Spath[2], E. M. Rodríguez[3], L. D. Páez[1]
[1] Laboratorio del Campo-Ministerio de Medio Ambiente Campo y Producción-Gob. de San Luis
[2] INTA- Balcarce
[3] Ministerio de Medio Ambiente Campo y Producción-Gob. de San Luis
Autor responsable: mariagabrieladc@speedy.com.ar

Introducción

La neosporosis es una enfermedad reproductiva, producida por un protozoo, *Neospora caninum*, que afecta a animales salvajes y domésticos, tales como bovinos, ovinos, caprinos, equinos, caninos, ciervos (*Dubey, J.* and *Lindsay, D. (*1996)). En el ciclo parasitario los caninos son huéspedes definitivos e intermediarios y cumplen un rol primordial en la persistencia de la parasitosis y secundario en la transmisión de la misma; siendo la forma transplacentaria, la principal vía de transmisión (*Anderson* et al., 1997). Produce importantes pérdidas económicas, traducida en abortos, eliminación de seropositivos, reposición, menor producción láctea, mayor intervalo entre el parto y concepción (*INTA,* 2015).

En Argentina existen áreas endémicas y regiones donde la enfermedad no ha sido investigada. Diferentes trabajos reportan prevalencias en bovinos, por encima del 20% en rodeos lecheros y un poco menos en rodeos de cría, probablemente atribuible a las condiciones de manejo, que difieren en una y otra producción (*Fort* et al., 2015). La seroprevalencia, considerando establecimientos, supera el 90% en rodeos lecheros. En San Luis, no existen datos poblacionales acerca de la ocurrencia de esta patología en bovinos.

El diagnóstico serológico es el de elección tanto para estudios poblacionales como rodeos individuales. Las pruebas utilizadas con mayor frecuencia incluyen la IFI, Inmunoblotting (IB) e I- ELISA.

El propósito de este estudio fue determinar la prevalencia en rodeos bovinos lecheros de la Provincia de San Luis. El diagnóstico de situación permitirá a los establecimientos incluir esta patología dentro de las enfermedades reproductivas a investigar ante la presencia de signos compatibles con neosporosis.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de prevalencia, de corte transversal, analizando 17 establecimientos lecheros de la Provincia de San Luis.

El número de muestras por establecimiento, se estableció según estratos (Tabla 1), analizando 481 muestras en total. Se utilizó para la detección de anticuerpos frente a *N. caninum*, la prueba I-ELISA, de interacción primaria, usando un kit comercial, CIVTEST NEOSPORA, Laboratorios Hipra SA, según instrucciones del Kit.

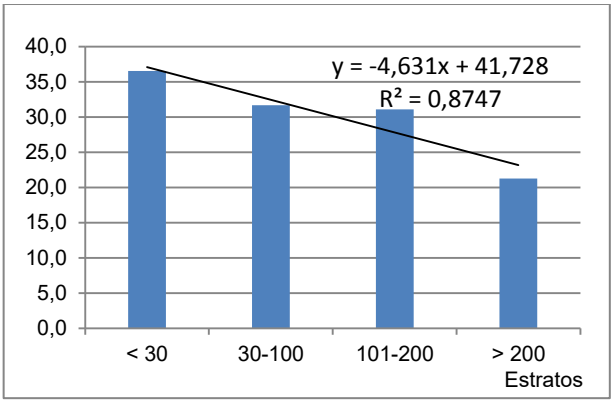
Tabla 1: Establecimientos y muestras analizadas para el diagnóstico serológico de Neosporosis

Estrato: N° vacas/tambo	N° Tambos	N° Muestras	Positivos	
			n	%
<30	5	69	23	33,3
30-100	4	120	38	31,7
100- 200	3	90	26	28,9
>200	5	202	43	21,3
TOTAL	17	481	130	27,0

Resultados

Un total de 130 muestras resultaron positivas al I- ELISA (27.0%) (Tabla 1), provenientes de 16 de los 17 establecimientos estudiados; solo 1 tambo, del estrato > 200 resultó negativo. Se observó un amplio rango de prevalencia por establecimiento, entre el 10% y 40%. Por otra parte, al agrupar las prevalencias según estratos, se pudo observar una relación indirecta entre los mismos (Gráfico 1).

Gráfico 1: Prevalencia de la Neosporosis según el estrato de los tambos estudiados



Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos, permiten inferir que, de manera similar a otras regiones estudiadas, la presencia de neosporosis en la Provincia de San Luis, debe ser tenida en cuenta al momento de diferenciar posibles causales de abortos, nacimientos de terneros muertos o débiles u otros problemas reproductivos. Por otra parte, es también relevante mensurar la problemática en los rodeos donde se encuentra presente esta parasitosis, considerando básicamente, que su control radica en medidas de manejo (*Moore* et al., 2001); teniendo en cuenta que la transmisión vertical, transplacentaria (responsable de más del 80% de la transmisión, *INTA*, 2015) y la cronicidad; constituyen los pilares epidemiológicos a considerar en el control.

Bibliografía

1- Anderson, M.L.; Reynolds, J.P.; Rowe, J.D.; Packham, A.E.; Barr, B.C. and Conrad, P.A. (1997). *Evidence of vertical transmission of Neospora sp. Infection in dairy cattle.* Journal of the American Veterinary Medical Association 210: 1169-1172.

2- Dubey, J.P. and Lindsay, D.S. (1996)*: A review of Neospora caninum. Veterinary parasitology* 67: 1-59.

3-Fort, M.; Edelsten, M.; Maley, S.; Innes, E. (2015). *Seroepidemiological study of Neospora caninum in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina.* Acta Parasitologica, 2015, 60(2), 275–282.

4-INTA (2015). *Neosporosis bovina*. N° 523.

5- Moore,D.P.; Odeón, A.C.; Campero,C.M.(2001) *Neosporosis bovina: una actualización.* Veterinaria Argentina Vol. XVIII. N° 180: 752-775.

E9- RELEVANCIA EN EL MANTENIMIENTO DE UNA COLECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS*

B. Vasini Rosell[1], V. Salazar[2], L. Mendez[2]; C. Morsella[2]; K. Cirone[2]; MA. Fiorentino[2]; A. Gioffre[3]; F. Paolicchi[2]
1. CONICET 2. Laboratorio de Bacteriologia, Grupo de Sanidad Animal, Unidad Integrada Balcarce INTA-UNMdP 3. Instituto de Biotecnología INTA Castela
paolicchi.fernando@inta.gob.ar

Introducción

El estudio de microorganismos patógenos para la salud animal implica en muchos casos el uso de cultivos vivos, los cuales deben ser preservados al menos durante el tiempo que dura en ensayo y en muchos casos, al resultar de interés biológico, es relevante poder conservarlos para futuros estudios. La correcta preservación de los microorganismos requiere del uso de técnicas modernas que debieran causar el mínimo daño en las células, asegurar la máxima viabilidad y estabilizar el comportamiento del genotipo[1]. Preservar bacterias en nitrógeno líquido es un método rutinario en el área de conservación de cepas. Las células pueden ser preservadas por largos períodos de tiempo y asegurando baja o nula mutabilidad de las células[2].

El laboratorio de Bacteriología del Grupo de Sanidad Animal de la EEA INTA Balcarce, cuenta con una importante colección de cepas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) contabilizando más de 350 cepas.

El objetivo del presente trabajo es describir la colección de cepas de Map pertenecientes al laboratorio y poner de relieve la importancia de su mantenimiento para estudios de referencia sobre la Paratuberculosis.

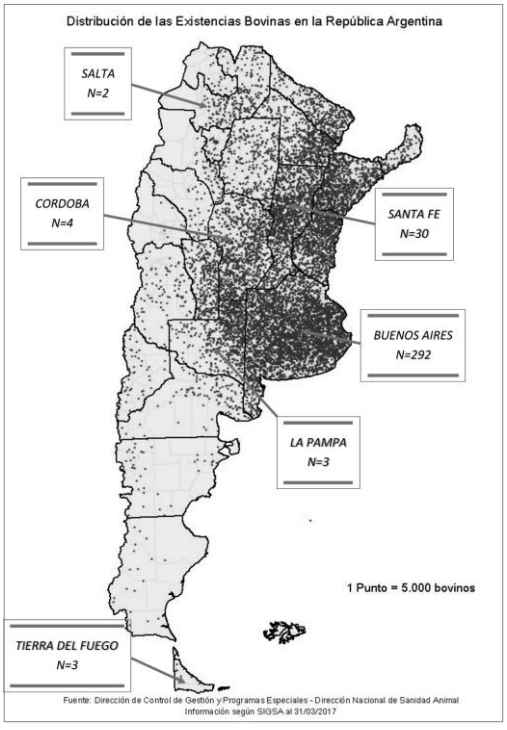


Figura 1: Distribución de los aislamientos de cepas de Map en Argentina pertenecientes a la colección del laboratorio: El mapa muestra la densidad de existencias de ganado bovino del país distribuidos por provincia (SENASA 2017).

Materiales y métodos

El cepario cuenta con 366 cepas aisladas desde 1988 hasta la actualidad y su procedencia es principalmente de la Provincia de Buenos Aires pero también desde otros sitios geográficos del país (Figura 1). Las cepas incluidas en la colección fueron aisladas en medios de cultivo específicos (Herrold/micobactina J/piruvato) y conservadas en medio con glicerol y mantenidas en nitrógeno líquido. Desde el año 2012 el laboratorio implementó el uso de técnicas moleculares para el diagnóstico y estas cepas han sido caracterizadas mediante PCR IS*900* específica para Map. A su vez, para la clasificación de las cepas de la colección han sido utilizados otros métodos moleculares como RFLP[3] (Restriction Fragment Length Polymorphism) y MLVA[4] (Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis).

Resultados

Sobre el total de 366 cepas, el 74% corresponden a aislamientos de bovinos (Gráfico 1) y dentro de estos, más del 80% provienen de cultivos de materia fecal (MF) y en menor medida de cultivos de órganos del tracto gastrointestinal (TGI 11%) y linfonodos (LN 7%).

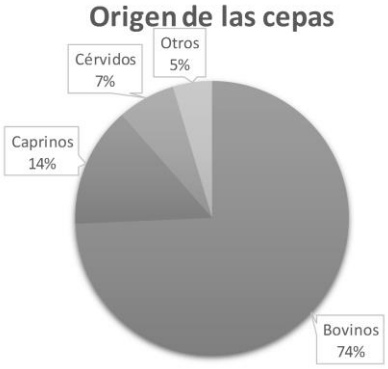


Gráfico 1: Porcentaje de cepas de la colección del laboratorio, aisladas y caracterizadas según la especie de origen.

El 60% de las cepas fueron analizadas por PCR IS*900* siendo todas positivas. De ese porcentaje, el 34% fueron posteriormente analizadas por RFLP obteniéndose 7 genotipos diferentes, mientras que un 43% fueron analizadas por MLVA caracterizando el perfil genotípico en 6 diferentes genotipos.

Discusión y conclusión

Esta colección microbiana de Map, además de significar un depósito de biodiversidad, es la base de proyectos de investigación destinados al mejoramiento en el diagnóstico y control de la Paratuberculosis, considerada un serio problema de alto impacto en la ganadería y para la economía del país.

Bibliografía

1- Safronova y Novikova (1996) Comparison of two methods… Journal of Mic Met 24(3), 231-237

-2 Wu et al. (2008) Liquid nitrogen cryopresevation of three kinds of… Trans Nonferrous Met Soc 18, 1386-1391.

3-Pavlik, I et al. (2010) IS*900* RFLP types of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in feaces… Vet Med, 55(1), 1-9

4-Thibault, V. C et al. (2007). New variable-number tandem-repeat marker… Journal of Clinical Microbiology, 45(8), 2404–2410. https://doi.org/10.1128/JCM.00476-07

E10- PREVALENCIA A *TRITRICHOMONAS FOETUS* EN TOROS DE UN RODEO COMERCIAL Y SU RELACIÓN CON LAS TASAS DE PREÑEZ

R.D. Neumann[1], A.O. Salatin[1], C. Thompson[2], I.E. Echaide[2], D.H. Aguirre[1].
1 Área de Salud Animal INTA IIACS/EEA Salta. 2 Laboratorio de Inmunología INTA EEA Rafaela
neumann.roberto@inta.gob.ar

Introducción

La Tricomonosis bovina (TB) es una enfermedad de transmisión sexual (ETS), el agente etiológico es el protozoo *Tritrichomonas foetus*, tiene amplia distribución mundial, y en nuestro país está presente en todas las zonas de cría bovina. Provoca pérdidas reproductivas afectando los porcentajes de preñez entre un 15 a 25% o aún mayores, según se encuentre sola o asociada a Campylobacteriosis genital bovina (Campero, 2002). Su forma de presentación es insidiosa, y en situaciones de manejo extensiva puede pasar desapercibida (BonDurant, 2005). En el presente trabajo se describen los resultados de análisis para TB de muestras prepuciales de toros de un rodeo comercial ubicado en el Departamento Rivadavia, provincia de Salta, y su relación con los porcentajes de preñez en los lotes de vacas que recibían servicio de esos toros. El servicio era natural, estacionado en tres meses entre diciembre y marzo. El porcentaje de toros era del 4%, los cuales estaban asignados a 21 lotes de 218 vacas en promedio. Se realizaba prevención de las enfermedades que afectan a la reproducción mediante vacunación de vientres y toros, y muestreo prepucial de estos últimos. La condición corporal de los vientres y toros previo al servicio era óptima, y no se registraron desbalances en la cadena forrajera durante el servicio y la posterior gestación.

Materiales y métodos

Se procesaron 188 muestras prepuciales inoculadas en caldo infusión hígado (Campero *et al*., 1986). El diagnóstico de TB se realizó mediante observación microscópica directa del medio de cultivo y confirmación etiológica mediante PCR (Felleisen, 1997; Felleisen *et al*., 1998)). Mediante una entrevista al veterinario del establecimiento se obtuvo la información de los diagnósticos de gestación por palpación rectal de los 4.579 vientres del campo, correspondientes al servicio del año 2017, previo al diagnóstico de ETS en los toros. El diagnóstico de gestación en los vientres y la obtención de las muestras prepuciales fueron realizadas por un mismo veterinario.

Resultados

Mediante observación microscópica directa se determinó la presencia de protozoarios flagelados compatibles con *T. foetus* en ocho toros, confirmados en todos los casos mediante PCR. Dichos toros estaban asignados a cuatro lotes y distribuidos como indica la Tabla 1. La prevalencia general de *T. foetus* en el establecimiento fue de 4,25%, en tanto osciló entre el 33,3% y el 11,1% en los lotes con toros infectados. El porcentaje de preñez general del establecimiento fue del 86,4%. En los lotes con toros libres de *T. foetus* el porcentaje de preñez promedio fue del 89,7% (rango 81,5-94,8), mientras que en aquellos con toros infectados por *T. foetus* fue del 71,3% (rango 65,6-77,5). En la Tabla 1 se consignan los porcentajes de preñez de los lotes con TB en relación con la cantidad de toros positivos a *T. foetus*.

Tabla 1

ID	% de preñez	Toros positivos a *T. foetus*
Lote 1	65,6	3
Lote 2	67,6	3
Lote 3	75,0	1
Lote 4	77,5	1

Discusión

La diferencia porcentual de preñez entre los lotes con toros infectados por *T. foetus* y el promedio del resto de los lotes varió entre el 12 y el 24%, índices similares a los reportados por Campero (2002). La mayor merma de preñez se registró al cotejar los lotes con más cantidad de toros positivos a *T. foetus*. El hecho de que en este rodeo cada unidad perdida en el porcentaje de preñez significó dos terneros menos, pone en evidencia el efecto perjudicial de la TB en el desempeño reproductivo de los rodeos de cría. A lo cual se suma el eventual descarte de los vientres improductivos en aquellos rodeos comerciales con alta presión de selección a fin de optimizar sus parámetros reproductivos.

Conclusión

No siempre es posible confrontar los resultados de laboratorio, con los datos productivos de los establecimientos. A su vez, en muchos casos las diferencias de los porcentajes de preñez, no son tan manifiestas (BonDurant, 2005). Esta información se considera de valor, ya que evidencia el efecto perjudicial sobre el porcentaje de preñez de las ETS en general y de la TB en particular, así como la importancia de su control mediante el muestreo sistemático de los toros antes del servicio.

Bibliografía

-BonDurant, R. 2005. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. Vet Clin Food Anim. 21: 383-408.

Campero, C.; Catena, M.; Medina, D. 1986. Caldo infusión hígado para el cultivo de *Tritrichomonas foetus*. Vet. Arg. 3 (21): 80-81.

-Campero, C. 2002. Pérdidas ocasionadas por las enfermedades venéreas de los bovinos. Rev. IDIA XXI 2: 127-131.

-Felleisen, R. 1997. Comparative sequence analysis of 5.8S RNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions os trichomonad protozoa. Parasitology 115: 111-119.

Felleisen, R.; Lambelet, N.; Bachmann, P.; Nicolet, J.; Müller, N.; Gottstein, B. 1998. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA Enzyme Immunosassay base don Rrna gene unit sequences. J. Clin. Microbiol. 36: 513-519.

E11- EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEPTOSPIROSIS EN BOVINOS DE CRÍA DE LA REGIÓN SUDESTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

M. Mazzanti[1*]; E. Scialfa [2,3]; O. García[4]; N. Crespo[4]; F. Meineri[4]; L. Martínez[4]; M. Rivero[1]; J. Passucci[1]
[1]Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), CONICET, FCV, UNCPBA. [2]Departamento Zoonosis Rurales Azul.
[3]Fac. Agronomía, UNCPBA. [4]Veterinarios actividad privada.
[*]marianamazzanti@hotmail.com

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a animales domésticos y silvestres, y es una de las zoonosis más frecuentemente diagnosticadas en el mundo. Los registros de prevalencia en bovinos varían entre regiones de nuestro país, 12,41% en Corrientes y 33,67% en Buenos Aires.

Los serovares adaptados al bovino suelen causar pérdidas reproductivas insidiosas, muchas veces subdiagnosticadas, (bajos títulos de anticuerpos). A pesar de la alta susceptibilidad a la infección, la patogenicidad es relativamente baja en los bovinos; los cursos de enfermedad suelen ser crónicos, generando una transmisión de tipo endémica en los rodeos. Por otro lado, los serovares no adaptados, provocan altas tasas de abortos, con elevadas pérdidas económicas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la tasa de positividad de *Leptospira* spp. en la provincia de Buenos Aires, así como factores de riesgo asociados a manejo, ambiente e individuo que determinarían la seropositividad bacteriana en dichos establecimientos.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio analítico mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia en diferentes establecimientos de la provincia de Buenos Aires (Ayacucho (1), Balcarce (1), Benito Juárez (6) y Tandil (2)). Se muestrearon 15 animales por establecimiento, con un total de 150 sueros colectados. Asimismo, se realizó una encuesta para recopilar información epidemiológica, con énfasis sobre los potenciales factores de riesgo asociados a la seropositividad a *Leptospira* spp.

Para el procesamiento de muestras, se utilizó el Test de Microaglutinación (MAT), la prueba serológica de referencia, teniendo en cuenta como criterio de positividad un título de ≥1:200. Se estimó la tasa de seropositividad con su correspondiente intervalo de confianza para el 95% (IC95%).

El cálculo de riesgo se realizó de manera bivariada y multivariada con el software Statistical Analysis Systems 9.4 (2016). Primero, se estimaron asociaciones entre hipotéticos factores de riesgo y la seropositividad por medio de Chi^2 o test exacto de Fisher (según corresponda), y se cuantificó el riesgo a través del OR con su IC95%. Los factores que resultaron significativos ($p<0,05$) fueron incluidos en un análisis multivariado (regresión logística); con la finalidad de controlar interacciones y confusiones entre factores, pudiendo estimar los factores que mejor expliquen la seropositividad. El ajuste del modelo se realizó por medio del test Hosmer y Lemeshow.

Resultados

Del total de animales muestreados, 34 fueron seropositivos, representando una tasa de positividad del 22,67% (IC95%: 15,63-29,7). El 80% de los establecimientos y el 75% de los partidos tuvieron tuvo al menos 1 individuo positivo. Las tasas de seropositividad según serovares fueron: Wolffi 16,66% (n=25), Hebdomadis 12% (n=18) y Hardjo 11,33% (n=17).

De los 34 seropositivos, el 47% (n=16) coaglutinó a dos o tres serovares.

Uno de los factores de riesgo significativos estimados en el análisis bivariado fue “ciclo abierto”, es decir la compra de hembras de reposición, (p=0,0001, OR=6,99, IC95%=2,32-21,14). Otro de los factores significativos fue “suelo no presenta lomas” (p=0,0269. OR=3,05, IC95%=1,09-8,49). Por último, el tercer factor significativo fue el “dejar los animales muertos en el campo”, sin utilización de fosa (p=0,0193, OR=5,09, IC95%=1,15-22,6).

En la regresión logística, fueron incorporados los tres factores significativos mencionados anteriormente, resultando que los factores que mejor explicarían la seropositividad fueron “Ciclo abierto” (p<0,0001, OR= 17,54, IC95%=5,40-55,5) y “suelo no presenta lomas” (p<0,0001, OR=10, IC95%=3,33-30,3). El modelo tuvo un buen ajuste (p>0,05).

Discusión y conclusiones

Los resultados del presente trabajo evidencian el carácter endémico de esta enfermedad en la región estudiada. Entre los factores de riesgo hallados, el “suelo no presenta lomas” puede explicarse por el mayor riesgo de encharcamiento de los terrenos bajos, que favorecería la supervivencia de *Leptospira* spp. De acuerdo a Alonso Andicoberry *et al*. (2001), los campos típicamente bajos y fácilmente encharcables generan un ecosistema favorable para el crecimiento y desarrollo de las leptospiras y sus reservorios. Por otro lado, el factor de riesgo “Ciclo abierto” puede explicarse por el hecho de que las hembras podrían provenir de establecimientos con problemas sanitarios de tipo reproductivo.

En Argentina los brotes de leptospirosis en bovinos han sido asociados al serovar Pomona, afectando a tambos, rodeos de cría y a feedlots. No obstante, en la región los serovares más reaccionantes a MAT son Wolffi, Hebdomadis y Hardjo, lo cual coincide con los resultados obtenidos. Esta enfermedad es considerada como no erradicable debido a la diversidad de reservorios existentes, por lo cual es importante extremar las medidas de prevención en el ganado.

Bibliografía

-Alonso Andicoberry *et al.* 2001. Invest Agr.: Prod. Sanid. Anim. 16: (2) 206-225.

-Draghi 2009. Situación epidemiológica de la leptospirosis animal en la Argentina. II Taller integrado de Leptospirosis de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de diagnóstico (AAVDL), pp. 14–16.

-Gamietea *et al.*, 2014. Datos preliminares sobre serovares de Leptospira spp. predominantes en bovinos de la región insular del partido de Campana, delta inferior bonaerense del río Parana, Argentina. In III Congreso Panamericano – VIII Congreso Argentino de Zoonosis.

-Molina Mola y Scialfa. Estudio retrospectivo de la leptospirosis animal. Departamento de Zoonosis Rurales (2014-2017). II Congreso Internacional de Zoonosis – IX Congreso Argentino de Zoonosis.

-Radostis *et al.* 2001. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9na Ed., McGraw-Hill–Interamericana de España, España.

E12- BRUCELOSIS BOVINA: 15 AÑOS DE TRABAJO CON PRODUCTORES FAMILIARES DE LA PROVINCIA DE MISIONES, ARGENTINA

C. Sturniolo[1], M. Macio[1], E. Sticotti[1], M. Schneider[1], G. Magnano[1], V. Nievas[1], C. Rang[1], J. Fernandez[1], J. Giraudo[1], A. Macias[1], A. Rojo[2], G. Gómez[3], D. Zubeldia[1], E. Bérgamo[1] y H. Lovera[1].
Universidad Nacional de Rio Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC-FAV).[2]Sub-Secretaría de Agricultura Familiar (SsAF). [3]Servicio Nacional de Sanidad y calidad Agroalimentaria (SENASA)
carosturniolo@gmail.com

Introducción

La brucelosis bovina es una zoonosis con importancia para la salud pública y la economía agropecuaria en la mayoría de los países en desarrollo. La permanencia de esta enfermedad limita las posibilidades del sector pecuario y la comercialización, influyendo negativamente en la rentabilidad de las explotaciones, en la calidad de los productos, en el consumo y en la salud pública. El impacto productivo y zoonótico de la brucelosis hace que sea considerada de suma importancia para la implementación de planes de control y erradicación. Esos planes, fácilmente aplicables en la región pampeana, son de difícil adaptación a las regiones con gran cantidad de productores familiares (Schneider y col. 2010)

Desde el año 2003, por iniciativa de un grupo de profesionales egresados de la UNRC que se ponen en contacto con docentes del departamento de Patología Animal de la FAV, se inicia la tarea de colaborar en el diagnóstico de Brucelosis Bovina en establecimientos de agricultores familiares de la provincia de Misiones. Según los últimos datos disponibles del Censo Nacional Agropecuario, el 91% del total de las explotaciones misioneras pertenecen a la Agricultura Familiar. En el caso particular de los productores a los que involucra este trabajo, la mayoría no superan las 25 hectáreas de tierras, con un promedio de entre 5 y 20 animales cada uno. El trabajo desarrollado a los largo de 15 años, inicialmente realizado como una iniciativa extracurricular, es hoy una materia de 6to año de la carrera de Medicina Veterinaria de la UNRC, y se articula en el territorio con instituciones como SENASA, Secretaría de Agricultura Familiar, Coordinación y Desarrollo Territorial del Ministerio de Agroindustria de la Nación, INTERFERIAS, Ministerio del Agro y la Producción, la Secretaría de Estado de Agricultura Familiar de la provincia de Misiones, productores pertenecientes a las Ferias Francas y cooperativas de Misiones..

El objetivo de este trabajo es presentar el estado de situación de la Brucelosis Bovina de Productores Familiares de la Provincia de Misiones.

Materiales y métodos

El trabajo en el territorio se llevó adelante siempre durante el mes de agosto. Previamente, los estudiantes recibieron talleres de caracterización socio-productiva de la región geográfica a la que se va, e intensificación en la preparación técnica. Una vez en el territorio, se conformaron entre 10 y 15 grupos de trabajo de 2 o 3 estudiantes –dependiendo de la organización operativa previa de cada año- que se distribuyeron a lo largo de toda la provincia, en todos los casos acompañados por un técnico local. Los estudiantes convivieron una semana con productores locales, y realizaron el muestreo para el diagnóstico de Brucelosis en bovinos mayores a 18 meses. Cada grupo de trabajo realizó además encuestas socio-productivas a los productores. De regreso a Rio Cuarto, se realizó el diagnostico serológico mediante la prueba de Antígeno Buferado en Placa (BPA) y sus complementarias -Seroaglutinación en Tubo (SAT) y 2-Mercapto etanol (2ME)-, estandarizadas por SENASA. Se realizaron también informes finales de las actividades al regreso de las mismas.

A lo largo de 15 años de trabajo se muestrearon un total de 6.649 animales, nucleados en 1.076 productores.

Resultados

AÑO	Productores	Animales muestreados	Animales Positivos %
2003	112	525	0
2004	140	657	0
2005	132	720	0
2006	157	803	0
2007	111	664	0
2008	168	806	0
2009	138	784	0
2010	157	810	0
2011	212	1069	0
2012	86	815	0
2013	144	762	0
2014	168	1176	0
2015	138	1320	0
2016	176	852	0
2017	152	655	0
Total al 2017	**1.076**	**6.649 animales**	**0 %**

Discusión y conclusión

Según datos que informa SENASA, en el informe de un muestreo para determinación de prevalencias de brucelosis bovina en la zona de mayor producción bovina en la Argentina realizado en 2014, existe una prevalencia animal de 0,81% y una prevalencia de establecimientos del 12,35 %.

Si bien los muestreos realizados a lo largo de 15 años, no responden a criterios estrictamente estadísticos, pensamos que representan una buena base de datos para considerar que la Brucelosis bovina en productores familiares de la provincia de Misiones, no es un problema en la producción.

Si bien los resultados son más que alentadores, consideramos que la no vacunación del total de animales, tal como lo contempla el plan nacional, es un posible riesgo de presentación de la enfermedad, así como también el ingreso de animales desde otras zonas, tal como lo mencionan algunos productores en las encuestas. No obstante en la mayoría de los casos el movimiento de animales se realiza en un círculo bastante cerrado, lo que creemos permite mantener prevalencias en cero.

El Cuarto Informe de Expertos en Brucelosis (1964) aconseja que la lucha contra la Brucelosis bovina y su erradicación puede emprenderse teniendo en cuenta el nivel de prevalencia de los rebaños y animales para definir las estrategias. Es en este sentido entonces que planteamos la necesidad de adecuar los planes nacionales vigentes al estado de situación actual, contemplando específicamente las características productivas y socio-económicas de los productores familiares, y diseñar, en función de los resultados y riesgos planteados, un plan de vigilancia para prevenir el ingreso de la enfermedad a los establecimientos.

Bibliografía

-Dirección Nacional de Sanidad Animal -SENASA- (2014); Informe del muestreo para determinación de prevalencias de brucelosis bovina en la zona de mayor producción bovina en la republica argentina año 2014.

-Informe de Expertos en Brucelosis, Comité Mixto FAO/OPS, Ginebra 1964.

-Manzanal, M y col. (2014). «Agricultura Familiar Y Soberanía Alimentaria. Políticas Públicas En Misiones Y Buenos Aires (Argentina)». Eutopía, Revista De Desarrollo Económico Territorial, n.º 6 (diciembre), 11-24

-Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina (Resolución Senasa Nº 150/2002)

-Schneider, M. y col. (2010) Trayecto, actualidad y proyección de un trabajo interinstitucional en el diagnóstico de brucelosis y tuberculosis en bovinos pertenecientes a productores familiares de la provincia de misiones, Presentado en XXIX Jornadas de Actualización en Ciencias Veterinarias (Villa Giardino, Cba.)

E13- RELEVAMIENTO DE BRUCELOSIS EN CABRAS DE PRODUCTORES FAMILIARES DEL NOROESTE DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA, ARGENTINA

M. Macio[1], E. Sticotti[1], M. Schneider[1], G. Magnano[1], V. Nievas[1], C. Rang[1], C. Sturniolo[1], J. Fernandez[1], A. Macias[1], P. Toranzo [5], B. Agnelli[2,5], L. Aparicio[2], F. Sarri[2], M. Fernández[3], C. Gramaglia[4], Morán L.[6], J. Giraudo[1].
[1]Universidad Nacional de Rio Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC-FAV). [2]Sub-Secretaría de Agricultura Familiar (SsAF). [3]Servicio Nacional de Sanidad y calidad Agroalimentaria (SENASA). [4]Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). [5]Movimiento Campesino de Córdoba. [6]Médico Veterinario, actividad privada.
mmacio@ayv.unrc.edu.ar

Introducción

La Brucelosis caprina en una zoonosis importante en algunas regiones productoras de caprinos en la Argentina. En los hatos infectados por *brucella* en forma crónica, la enfermedad se vuelve evidente a través de las personas que se enferman de brucelosis por el contacto permanente con los animales o por haber consumido leche o quesos procedentes de los mismos. Según la bibliografía, se infiere que la brucelosis en Argentina no está distribuida de forma homogénea, sino que se identifican claramente zonas de alta, media, baja y nula prevalencia (Robles, 2009).
Productores caprineros de la región de traslasierra (Córdoba), organizados en el Movimiento Campesino de Córdoba, en conjunto con instituciones gubernamentales que trabajan en el territorio, como SENASA, INTA, SsAF, se contactaron con la UNRC, para plantear la demanda de conocer el estatus sanitario de las principales enfermedades zoonóticas que podrían estar presentes en sus cabras.
En 2017, en el marco de esta articulación, se realizó un muestreo de 43 hatos y 1465 animales en la región arrojando una prevalencia nula (0%) de Brucelosis (Sticotti y col. 2017).
El objetivo de presente estudio fue ampliar la investigación sobre la presencia de brucelosis en hatos de productores caprinos en los parajes de los departamentos de San Alberto, San Javier, Pocho, Minas y Cruz del Eje de la provincia de Córdoba.

Figura 2 Departamentos donde se hizo el muestreo

Materiales y métodos

El trabajo se desarrolló el 11 y 12 junio de 2018. Participaron estudiantes y docentes de la FAV-UNRC, técnicos de las instituciones involucradas, profesionales de la actividad privada y productores. Se formaron 10 equipos de trabajo con, al menos, 2 estudiantes, un docente y un referente territorial (hubo equipos más numerosos).
Se visitaron, para realizar el abordaje sanitario, 58 hatos caprinos que poseían 3523 animales, recolectando un total de 1883 muestras de suero de reproductores adultos. Simultáneamente se realizó una encuesta sanitaria. Gran parte de esa información no es publicada en este trabajo. No se repitieron hatos que habían sido visitados en 2017.
Los sueros se refrigeraron y se trasladaron a los laboratorios del departamento de Patología Animal de la UNRC donde se realizaron las técnicas de Antígeno Buferado en Placa (BPA) como prueba tamiz, y luego Seroaglutinación en Tubo (SAT) y 2-Mercapto etanol (2ME) a los sueros positivos.

Resultados

De los 1883 sueros recolectados, solo dos fueron positivos a la técnica de BPA, aunque luego fueron negativos a SAT y 2ME.
La prevalencia encontrada en este muestreo fue del 0% y refuerza la validez del resultado encontrado por Sticotti y col. en 2017. Si sumamos ambos muestreos se llegó a 101 hatos y se tomaron 3348 muestras en la región estudiada en un período de 12 meses.
En las encuestas realizadas la mayoría, indicó incorporar animales por reposición propia y/o intercambia reproductores entre vecinos.

Discusión y conclusión

Estos resultados, coinciden con relevamientos realizados en la región por autores como Tribulo y col. (2002) quienes evaluaron 9.541 caprinos de 107 hatos de los departamentos de Tulumba, Rio Seco, Cruz del Eje, Minas, Pocho, San Alberto y San Javier, utilizando BPA, SAT y 2ME. Determinaron que la prevalencia en individuos era del 0,6% con un 6,5% de hatos positivos, donde los departamentos de Rio Seco, San Alberto y San Javier no presentaron reactores positivos. También Manazza y col. (2012) realizaron un relevamiento en 76 hatos caprinos de los departamentos de Cruz del Eje y Pocho y donde analizaron un total de 2.283 sueros, no encontrando reactores positivos a la técnica de BPA. Vanzini y col., (2012) muestrearon 16 establecimientos caprinos en la provincia de Córdoba, con la finalidad de detectar hatos libres. En Ischilin muestrearon 1619 caprinos de 13 hatos, en Tulumba 234 caprinos de 2 hatos y en San Javier, 150 caprinos de 1 hato. Las muestras se procesaron mediante BPA, Fijación de Complemento, ELISA-i, ELISA-c y FPA, resultando todas negativas.
Una de las causas del status sanitario encontrado en este trabajo, podría ser la poca introducción de animales a los rodeos desde zonas caprineras con prevalencias madias o altas de la enfermedad.
La situación sanitaria con respecto a Brucelosis en los caprinos estudiados es alentadora, podemos categorizar esta región como de muy baja o nula prevalencia de brucelosis caprina. Consideramos importante profundizar las actividades tendientes a mantener los hatos negativos. Por otro lado, la articulación interinstitucional que permitió este trabajo establece las condiciones para avanzar a una planificación de políticas sanitarias regionales con el objetivo de fortalecer a los productores organizados de la región.

Bibliografías

- STICOTTI E. y col. (2017). Relevamiento de brucelosis en cabras de productores familiares del noroeste de la provincia de córdoba, Argentina. Resumen presentado en las XXXVI Jornadas de Actualización Colegio Veterinario de Córdoba. V. Giardino.
-MANAZZA, J. y col. (2012). Brucelosis, neosporosis, toxoplasmosis y paratuberculosis en caprinos para carne y leche en el noroeste de Córdoba. Memorias. XIXa Reunión Científico Técnica de la AAVLD.
-ROBLES C. (2009). Brucelosis Caprina, 1ª edición. INTA. EEA Bariloche. p.13.
-TRIBULO, H. y col. (2002) Estudio de la prevalencia de Brucelosis y Tuberculosis en hatos caprinos de la región centro y norte de la provincia de Córdoba. XIV Reunión Científico Técnica de la AAVLD. Villa General Belgrano, Córdoba.
-VANZINI, V.; y col. (2012). Informe técnico del proyecto AESA 202811. INTA.

E14- INFLUENZA EQUINA: HALLAZGOS EPIDEMIOLOGICOS Y MOLECULARES DEL BROTE OCURRIDO EN ARGENTINA EN 2018

Olguin Perglione C.[1], Vissani MA.[1,2]; Alamos F.[1]; Tordoya MS.[1]; Ruzzante G.[3]; Campodónico R.[4]; Costa A.[5]; Zambruno T.[5]; Comero A.[3]; Negrelli C.[3]; Langhof A.[6]; Rodger A.[3]; Brust A.[6]; Gonzalez, C[7]., Corona, P[6]., Chunco, C[6]., Valle C.[3]; Barrandeguy M[1,2]

[1]Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Virología; [2]Escuela de Veterinaria, Universidad del Salvador, Pilar, Buenos Aires, [3]Médico Veterinario, actividad privada, Buenos Aires, [4]Hipódromo de Palermo, CABA, [5]Hipódromo de San Isidro, Buenos Aires, [6]Ejército Argentino, [7]Gendarmería Nacional.

olguin.cecilia@inta.gob.ar

Introducción

La Influenza equina (IE) es una enfermedad respiratoria aguda contagiosa, endémica en casi todo el mundo, con un elevado impacto económico debido a su alta transmisibilidad. Es producida por el virus de Influenza equina (VIE) H3N8, que desde su primera detección en el año 1963, ha sido responsable de los brotes de la enfermedad en equinos a nivel mundial, incluidos algunos países Sudamericanos. El último brote de IE reportado en Sudamérica, fue en el año 2012, detectándose la circulación del virus del sublinaje Florida clado 1 en Chile, Uruguay, Brasil y Argentina.

Objetivo: presentar los hallazgos epidemiológicos y moleculares de los virus detectados en el brote de IE ocurrido en la Argentina entre marzo y julio del año 2018.

Materiales y métodos

Se obtuvieron muestras de hisopados nasofaríngeos (HN) de 74 animales que presentaban signos de enfermedad respiratoria aguda, caracterizada por fiebre, tos y secreción nasal. Adicionalmente, se obtuvieron muestras de sangre entera sin anticoagulante de animales afectados durante el periodo agudo (n= 54) y convalecencia (n= 33). En el momento del muestreo se obtuvieron datos acerca de la edad del animal, fecha de la última vacunación y marca de vacuna utilizada.

Los HN fueron analizados por la técnica de Real Time RT-PCR para la detección del gen de la proteína M del virus de Influenza A. A partir de las muestras positivas se amplificó y secuenció el gen de la Hemaglutinina (HA) por OneStep RT-PCR; y se realizó un análisis filogenético junto a cepas de referencia obtenidas de la base de datos *Influenza Research Database*.

Las muestras de suero fueron analizadas por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación para la detección de anticuerpos contra el virus de influenza equina.

Estos ensayos fueron realizados en concordancia con las recomendaciones descriptas en el Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres de la OIE.

Resultados

Entre el 23 marzo y 10 julio de 2018, el virus de Influenza equina fue detectado en 11 establecimientos en diferentes provincias de la Argentina. Inicialmente, la enfermedad fue detectada en animales de la raza sangre pura de carrera alojados en los hipódromos de Mendoza, Palermo, San Isidro y La Plata, y posteriormente se confirmó en animales de silla argentina, salto y polo alojados en centros ecuestres de Hurlingham, Capilla del Señor, Pilar, Tandil y San Miguel.

El 64% de los animales afectados tenían entre 1 y 6 años de edad. El 61% de los mismos presentaban al menos una vacunación dentro de los 3 meses anteriores al muestreo. De estos animales, el 76% había sido vacunado con una vacuna importada mientras que el 24% de con una vacuna nacional.

El VIE fue detectado en el 58% (43/74) de los HN analizados. El análisis filogenético del gen de la HA demostró que los virus circulantes en este brote en Argentina pertenecen al subtipo H3N8 y agrupan dentro del sublinaje Florida clado 1. El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos (aa) demostró que estos virus presentan un 99% de identidad de secuencias con cepas aisladas en Escocia, Japón y Estados Unidos en los años 2018, 2017 y 2016 respectivamente. Al comparar estas cepas con la presente en la vacuna importada utilizada en nuestro país, se observó que las mismas presentaban 14 diferencias de aa, 5 de las cuales se encuentran en sitios antigénicos, mientras que, con respecto a la vacuna nacional, se encontraron 4 sustituciones de aa, 2 de ellas en sitios antigénicos.

Al analizar las muestras de suero, se observó que el 30% (16/54) de los animales presentaba niveles de anticuerpos, bajos, el 33% (18/54) intermedios y el 37% (37/54) altos. En el 61% (33/54) de estos animales, también se detectó el VIE. Dentro de este grupo, el 43% (14/33) de los animales presentaba niveles de anticuerpos bajos mientras que el 33% (11/33) y 24% (8/33) presentaba niveles intermedios y altos respectivamente. Todos los animales infectados seroconvirtieron o demostraron un aumento en el título de anticuerpos en la muestra tomada durante el periodo de convalecencia.

Discusión

El brote de Influenza equina ocurrido en la Argentina entre marzo y julio de 2018, fue producido por un virus H3N8 del clado Florida 1, diferente al circulante en Sudamérica durante el brote del año 2012. Si bien el origen de este virus no pudo ser determinado, temporal y geográficamente, su ingreso podría haber sido a través del movimiento de animales desde Chile, país en el que se produjo un brote de IE en enero de este mismo año.

El análisis molecular de las cepas detectadas en el año 2018 demostró que las mismas poseen diferencias con las detectadas en el año 2012 en Sudamérica, aunque estas diferencias no serían tan importantes como para comprometer la antigenicidad viral. Sin embargo, la comparación de la cepa Argentina de 2018 con la cepa contenida en la vacuna importada, se observaron diferencias en sitios antigénicos que sí podrían tener implicancias biológicas que afecten su reconocimiento por parte de los anticuerpos vacunales. Esto podría explicar el hecho de que durante este brote, el 61% de los animales afectados estaban vacunados y que el 57% de los animales que se infectaron, tenían niveles de anticuerpos intermedios o altos.

En este sentido, teniendo en cuenta las importantes perdidas económicas que produce esta enfermedad en la industria hípica, es necesario aplicar medidas de bioseguridad y cuarentena apropiadas, establecer programas de vacunación sistemáticos de todos los animales, utilizando vacunas que contengan cepas virales actualizadas y mantener rigurosos programas de vigilancia epidemiológica, para disminuir el riesgo de nuevos brotes de esta enfermedad.

Bibliografía

OIE, *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals,* 7ma Edición, 2016.

E15- REGISTRO DE *OLIGORYZOMYS LONGICAUDATUS* Y ANÁLISIS SEROLÓGICO FRENTE A VIRUS ANDES EN LA PATAGONIA NORTE EXTRA-ANDINA

M. Winter[1], S.D. Abate[1], R.D. Sage[2], R. Coelho[3], V.P. Martinez[3]
[1]Centro de Investigaciones y transferencia Río Negro (CONICET-UNRN), [2]Sociedad Naturalista Andino Patagónica (SNAP), Río Negro, [3]Laboratorio Nacional de Referencia para Hantavirus, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".
mwinter@unrn.edu.ar

Introducción

Oligoryzomys longicaudatus o "ratón colilargo", es el reservorio primario del virus Andes (ANDV) genotipo Sur, agente etiológico del síndrome cardio-pulmonar por hantavirus. El hombre al infectarse puede desarrollar un cuadro clínico grave con elevada mortalidad. El control de esta zoonosis se basa en la rapidez de la sospecha clínica en personas con sintomatología compatible, considerando para ello la distribución del reservorio. Existen escasas referencias sobre la distribución espacial de *O. longicaudatus* en Patagonia norte extra-andina, incluyendo el sur de la provincia de Bs. As. El objetivo del presente trabajo fue realizar un monitoreo sanitario en roedores silvestres, determinación de distribución de *O. longicaudatus* y circulación de ANDV por ELISA.

Materiales y métodos

En el marco de investigaciones sanitarias en fauna silvestre, se realizaron campañas de captura y remoción de roedores utilizando transectas de 40 trampas tipo Sherman con avena como cebo. En otoño-invierno, durante 2 noches consecutivas en 2016 y tres noches consecutivas en 2017 y 2018. El área de muestreo posee escasa cobertura vegetal constituida por flora nativa, con predominio de *Larrea cuneifolia* alternada con agrocultivos. Se encuentra a 50 metros de la ruta nacional n° 3 y en sus alrededores habitan pobladores rurales. La identificación de las capturas se realizó considerando medidas corporales y características anatómicas externas, diseño de molares superiores y morfología del cráneo. El diagnóstico de infección viral se realizó por determinación de presencia de anticuerpos IgG específicos contra el virus Andes mediante la técnica adaptada de ELISA directa (Padula, 2000), usando una dilución del suero 1:200 y anticuerpo conjugado anti IgG con peroxidasa específico para roedores sigmodontinos (*Peromyscus leucopus* - KPL) y un lector de Microplacas BioRad iMark Reader.

Resultados

En uno de los sitios de trampeo (40°28´/62°48´) (Figura 1) se capturaron dos individuos de *O. longicaudatus* (Figura 2) en la campaña de 2017, y dos durante la campaña de 2018. En todos los casos, las capturas se realizaron en la misma zona de transecta pero en días diferentes. Los ejemplares capturados en 2017 resultaron negativos a la presencia de anticuerpos IgG para nucleoproteínas del hantavirus Andes. Los estudios sobre los animales capturados en 2018 se encuentran en curso.

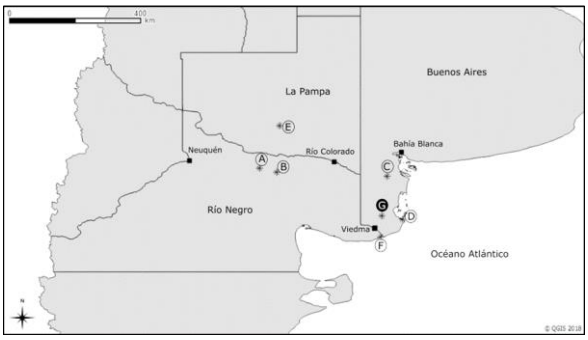


Figura 1. Nuevo punto de captura de *O. longicaudatus* (G) y sitios históricos de captura en Patagonia extra-andina: año 1928 (A), año 1940 (B), año 1973 (C y D), año 1985 (E). Año 2012 (F) (comunicación personal Sage).

Figura 2. Ejemplar de *O. longicaudatus* capturado y cráneo en vista ventral de uno de los ejemplares de *O. longicaudatus* capturados.

Discusión y conclusión

La proporción de *O. longicaudatus* sobre el total de roedores capturados fue de n (4/108) = 0,037. En transectas de 500 metros sobre las cuales se colocaron 40 trampas, todas las capturas se realizaron en 3 puntos de trampeo contiguos, poniendo en evidencia un patrón de distribución agregada.
Si bien los resultados serológicos fueron negativos, la captura de dos "ratones colilargos" contribuye al conocimiento de la ecología de *O. longicaudatus* en un zona con escasa información, dada la distribución asimétrica de los esfuerzos de captura. Esta información resulta de gran importancia para la planificación de acciones preventivas en Salud Pública, ante los nuevos escenarios ecosistémicos de la Patagonia norte, dados por el incremento del desmonte, el desplazamiento de la frontera agrícola, e impactos del cambio climático.

Bibliografía

-Padula PJ, Rossi CM, Della Valle MO, Martinez PV, Colavecchia SB, Edelstein A, Miguel SDL, Rabinovich RD, Segura EL. 2000. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. J Med Microbiol, 49: 149-155.
-Patton, JL, Pardiñas, UFJ y D'elía, G. 2015. Mammals of South America, vol 2 Rodents. Chicago, The University of Chicago Press, p. 427-429.

E16- SEROPREVALENCIA DE NEOSPOROSIS EN PEQUEÑOS RUMIANTES MEDIANTE IFI y ELISA DE COMPETICIÓN BASADO EN LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SAG1

M.B. Novoa[1, 2], N. Aguirre[1], N. Ormaechea[3], S. Palmero[3], L. Rouzic[3], V. Orcellet[3], B. Valentini[1], M. Sarli[1, 2], ME. Primo[1, 2], V. Vanzini[1], I.Echaide[1]
[1]EEA Rafaela – INTA. [2]CONICET. [3]FCV – UNL.
novoa.maria@inta.gob.ar

Introducción

La neosporosis, causada por el parásito intracelular obligado *Neospora caninum,* es una enfermedad global que afecta diferentes especies de animales domésticos y silvestres, entre ellos bovinos y pequeños rumiantes. La inoculación experimental de *N. caninum* a ovinos y caprinos genera abortos y transmisión transplacentaria[1]. También se reportó a la neosporosis como causante de fallas reproductivas en una majada ovina[2]. En trabajos realizados en la pampa humeda en Argentina[3] y en el estado de San Pablo en Brasil[4] se reportaron prevalencias de neosporosis del 3% y del 9% respectivamente.

El objetivo de este trabajo fue establecer la prevalencia de neosporosis en caprinos y ovinos de las provincias de Entre Ríos y Santa Fe, utilizando inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y un ELISA de competición (cELISA) basado en la proteína de superficie SAG1 de *N. caninum*.

Materiales y métodos

Se analizaron 1901 muestras de suero de 1483 cabras y 418 ovejas de 201 majadas de las provincias de Entre Ríos y Santa Fe (Tabla 1).

Los sueros se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) en dilución 1:50[5]. La prueba de cELISA se basó en la proteína recombinante truncada (tSAG1) expresada en *Escherichia coli* y el anticuerpo monoclonal (AcM) P1C2D8F8 que la reconoce específicamente. Brevemente, se expresó en *E. coli* la proteína de superficie SAG1 truncada (sin péptido señal y porción transmembrana c-terminal). Se tapizaron placas de 96 pocillos con 50 µl de tSAG1 (1 µg/µl) diluido en PBS y se incubaron ON a 4ºC. Luego de dos lavados con PBS, las placas se bloquearon con *buffer* de bloqueo (PBS + 10% de leche descremada). Las placas se lavaron 3 veces con *buffer* de lavado (PBS + 0,05% de tween20) y se agregaron 100µl de los sueros para diagnóstico y los controles, diluidos 1:2. La placa se lavó 3 veces con *buffer* de lavado y se incubó con el AcM diluido 1:2000. Se repitieron los lavados y se agregó el anticuerpo anti IgG1 de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:4000. La reacción se reveló con ABTs/H_2O_2 y la DO_{405nm} se midió a los 10 minutos. Todas las incubaciones se realizaron durante 40 minutos a 25ºC y los sueros y reactivos se diluyeron en *buffer* de lavado con 10% de leche descremada.

Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición (I%), tomando como referencia la densidad óptica que genera la reacción entre el AcM y su epitope específico, sin interferencia de suero según la siguiente formula:

$I\% = 100-[(OD_{muestra} x100)/OD_{AcM+tSAG1}]$.

Se determinó el punto de corte, la sensibilidad (Se) y especificidad (Es) de $cELISA_{tSAG1}$ respecto de IFI mediante el análisis de la curva de características operantes de un receptor (ROC). La concordancia entre cELISA e IFI se evaluó mediante el valor *kappa (k)* usando el programa MedCalc.

Resultados

El $cELISA_{tSAG1}$ demostró una Se de 94,5% y una Es de 94,3% con un punto de corte de 30%I (Figura 1). La concordancia entre $cELISA_{tSAG1}$ e IFI fue 94,4% con un k = 0,789.

Se detectaron anticuerpos contra *N. caninum* en ovinos y caprinos de la región analizada. En ambas provincias, más del 45% de las majadas tuvo al menos un animal seropositivo.

En animales la prevalencia de neosporosis fue similar en ambas especies y provincias siendo en todos los casos superior al 10% (Tabla 1).

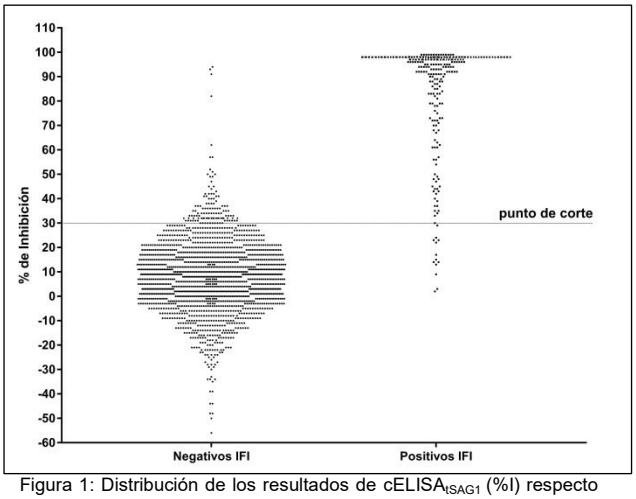


Figura 1: Distribución de los resultados de $cELISA_{tSAG1}$ (%I) respecto de IFI para la neosporosis en pequeños rumiantes. (Análisis ROC).

Especie	Provincia	Majadas Analizadas	Prevalencia Majadas (%)	Animales Analizados	Prevalencia Animales (%)
Ovinos	Santa Fe	2	100	20	10
	E. Ríos	46	60,8	398	14,5
Caprinos	Santa Fe	93	60,2	941	13,1
	E. Ríos	60	46,6	542	12,9

Tabla 1: Neosporosis en pequeños rumiantes de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos. Prevalencia en majadas (n=201) y animales (n=1901) analizados.

Discusión y conclusiones

Los resultados evidencian la presencia de neosporosis en ovinos y caprinos de las provincias de Entre Ríos y Santa Fe. La prevalencia encontrada fue superior a la reportada en la pampa húmeda, y similar a la reportada en Brasil.

La eficiencia del $cELISA_{tSAG1}$ y su concordancia con IFI, indican que podría utilizarse para estudios de seroprevalencia de neosporosis en pequeños rumiantes, porque admite una interpretación objetiva de los resultados, es automatizable y permite procesar gran número de muestras diarias. El uso de antígenos recombinantes favorecería la estandarización de la técnica y la transferencia de la misma. Se deberá establecer la asoiación entre la seroprevalencia observada y la ocurrencia de casos clínicos (abortos) mediante pruebas directas (PCR, IHQ, aislamiento), para conocer el efecto de la neosporosis sobre la eficiencia reproductiva en pequeños rumiantes.

Bibliografía

1- Buxton D, *et al*. Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. *Parasite Immunol*. 2001;23(2):85-91.

2- González-Warleta M, *et al. Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. Veterinary Research 2014;45-88.

3- Hecker Y, *et al.* First report of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy sheep from Humid Pampa. Trop Anim Health Prod. 2013;45:1645-1647

4- Figliuolo LPC, *et al.* Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. Vet. Parasitol. 2004;123:161-166

5- Jolley WR, *et al*. Repetitive abortion in *Neospora caninum* infected ewes. Vet. Parasitol. 1999; 82:251-257

E17- RELEVAMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS OBTENIDOS EN EL LABORATORIO ESCUELA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DURANTE 2016-2018

P. Franco[1], A. Etchecopaz[1], G. Retamar[1], K. Castillo[1], A . Perez[1], N. Lanza[1], N. Sarcone[1], JM. Gallardo[1], M. Fernandez[1], M. Rossano[1], C. Bustos[1], M. Mesplet[1], A. Muñoz[1]
[1] Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Enfermedades Infecciosas – infeccio@fvet.uba.ar

Introducción

Desde el año 2006 en el ámbito del Laboratorio Escuela de Enfermedades Infecciosas (LEEI) de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas, FCV, UBA se procesan muestras clínicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas veterinarias. En este espacio, profesionales, estudiantes y docentes, comparten, en forma organizada, la experiencia y la casuística en enfermedades infecciosas, brindando método y continuidad al proceso de formación académica, transferencia y servicio a la comunidad.
El objetivo de este trabajo fue relevar los aislamientos bacterianos y la sensibilidad antimicrobiana de los mismos, obtenidos en el LEEI durante 2016-2018.

Materiales y métodos

Se analizó un total de 201 muestras que fueron remitidas al LEEI para diagnóstico bacteriológico durante el período 2016-2018.
Las muestras fueron procesadas según el protocolo de rutina para aislamiento bacteriológico, para posteriormente ser identificadas mediante pruebas bioquímicas según esquema propuesto por Cowan and Steel's (2006). Se realizó el antibiograma de dichos aislamientos mediante el método de difusión con discos según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2013).

Resultados

Del total de muestras de origen clínico recibidas para diagnóstico bacteriológico (n=201) en el laboratorio se obtuvieron 145 muestras con cultivos bacterianos positivos (72,1 %). Las muestras procesadas provinieron de caninos (n=127), felinos (n=47), equinos (n=8), animales no tradicionales (n=7), aves (n=5) y rumiantes (n=2). En la figura 1 se muestran los porcentajes correspondientes a cada género bacteriano.

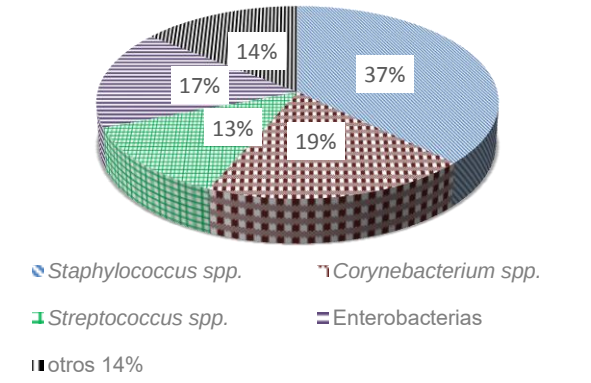


Figura 1: Resultados en porcentajes de los diferentes géneros bacterianos obtenidos en el LEEI durante 2016-2018.

Con 65 aislamientos, *Staphylococcus* spp. fue el agente predominante en las muestras estudiadas. En segundo lugar, con un total de 34 aislamientos, se ubicó el género *Corynebacterium* spp. Las enterobacterias se ubicaron en tercer lugar con 29 aislamientos destacándose la *E. coli* como enterobacteria predominante (*E. coli* 8%, *Klepsiella* spp. 4%, *Proteus* spp.. 2,3%, *Shigella* spp.. 1,14%, *Salmonella* spp. 1,14%). El género menos frecuente fue *Streptococcus* spp.

Todos los aislamientos obtenidos resultaron resistentes al menos a un grupo de antibióticos.

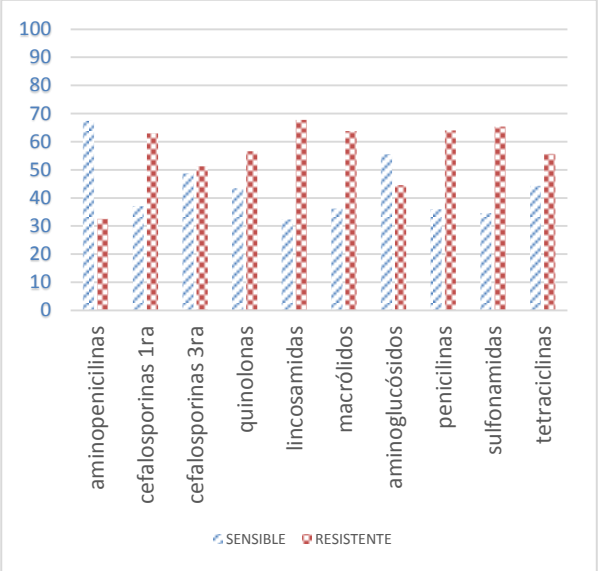


Figura 2: Porcentaje de susceptibilidad antimicrobiana observada para los aislamientos bacterianos obtenidos en el período 2016-2018 en el LEEI.

Discusión

Similar a lo reportado en años anteriores, *Staphylococcus* spp. fue el agente más aislado en nuestro laboratorio. Todos los aislamientos presentaron resistencia *in vitro* a al menos un grupo de antibióticos. Es notable, como se observa en la figura 2, que la mayoría de los aislamientos resultaron resistentes para la mayoría de los antibióticos testeados. Las excepciones del caso son las aminopenicilinas y los aminoglucósidos, antibióticos que no son tan utilizados como primera elección en tratamientos empíricos. Si bien, son múltiples los factores que determinan la resistencia antimicrobiana, los resultados obtenidos llaman la atención y remarcan la importancia de un correcto diagnóstico bacteriológico y evaluación de la susceptibilidad antibiótica en la clínica veterinaria.
En este trabajo reportamos y compartimos con la comunidad profesional la casuística de aislamientos bacterianos realizados en el LEEI durante los últimos 2 años.

Bibliografía

-*Cowan ST, Feltham, RK, Steel, KJ, Barrow, GI. (2006). Cowan and Steel's* Manual for the Identification of Medical Bacteria
-Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standards, Fourth Edition, VET 01-A4

Agradecimientos: a los alumnos del LEEI que procesaron las muestras.

E18- INFORME PRELIMINAR SOBRE INESTABILIDAD DE LA PREVALENCIA DE TRICHOMONOSIS, EN LA ZONA DEPRIMIDA DEL SALADO, PROVINCIA DE BUENOS AIRES

A. Niño Uribe[1]., J. Romero[1], F. Illanes[1], C. Cherrutti[1], C. Pruzzo[1]. A. Aldabe[2]
[1]CEDIVE, Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias, FCV. UNLP.
[2]Fundación de lucha contra la fiebre aftosa, Chascomús
alniur@gmail.com

.

Introducción

El CEDIVE recibe muestras para diagnóstico de enfermedades venéreas de distintos partidos de la zona deprimida del salado desde 1986.

Las prevalencias obtenidas en el periodo comprendido entre 1986 y principios de la década del 90, para Trichomonosis por establecimiento, variaron entre el 30% y 42%. A finales de los 90 descendieron a niveles levemente superiores al 20%, para luego seguir bajando. Todo esto dentro del contexto de los establecimientos que se acercaron al laboratorio. Esos valores se relativizaron con el diagnóstico diferencial de otros protozoos presentes (2,5 a 5% de los casos) mediante técnicas de coloración y PCR (Sánchez et al 2009). Entre 2012 y 2014 se observó un pico importante de incidencia, particularmente en campos del partido de Chascomús. El objetivo del presente es revisar la evolución tanto de la prevalencia individual en toros como a nivel de establecimientos, respecto a (*T.f*) en la zona de influencia del CEDIVE. Se discute la relación entre estos valores y las tasas aparentes de procreo observadas durante los años de mayor prevalencia de diagnósticos (2012-2014).

Materiales y métodos

El material procesado son muestras de raspado prepucial, remitidas por veterinarios particulares al servicio de diagnóstico del CEDIVE entre 2009 y 2017, para diagnóstico de *(T.f).* Las mismas son sembradas directamente en medio de cultivo de caldo de infusión de hígado bovino según Campero et al (1986) con suero bovino estéril y mezcla antibiótica, realizando lecturas diarias durante 7 días. Se analizan las prevalencias por establecimiento e individuales y se comparan los resultados en particular del partido de Chascomús en relación a los índices aparentes de procreo, obtenidos de los recuentos de terneros registrados en la vacunación de Aftosa del mes de octubre. Si bien estos recuentos no constituyen un censo, son representativos de las diferencias entre cohortes de establecimientos con y sin control de enfermedades venéreas. La significación de las diferencias se calculó por Análisis de la varianza.

Resultados

En los 9 años considerados, se recibieron muestras de 1054 establecimientos para diagnóstico de (*T.f.*) 48,5% de los cuales realizaron un único muestreo de diagnóstico, el 39,9% realizaron dos muestreos y solo el 11,6% más de 2. Esa tendencia se mantiene sin diferencias significativas aún en los últimos años. Sólo entre los que resultaron positivos, el 36,3% pertenecen al primer grupo (un muestreo), el 39,9% realizaron 2, y solo el 23,8 de ellos hicieron 3 o más muestreos. La evolución de la prevalencia entre establecimientos e individual se muestra en el gráfico 1. En particular para el partido de Chascomús, las prevalencias entre los años 2012, 2013 y 2014, resultaron las indicadas en la tabla 1, junto con las tasas de procreo aparente. Se encontraron diferencias significativas (p=0,009) en la cantidad de terneros de entre 1,3 y 5,4 puntos porcentuales.

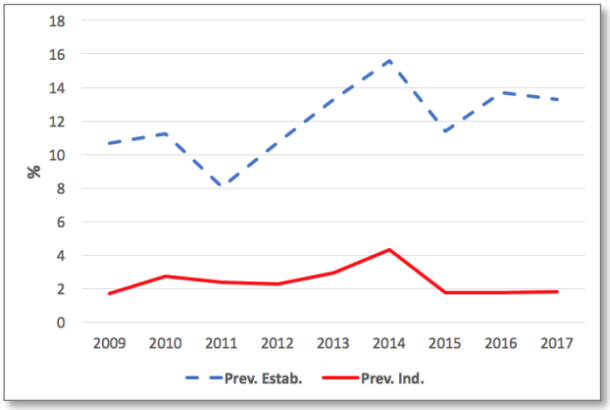


Gráfico 1: evolución de la prevalencia Individual y de Establecimiento de muestras recibidas en el periodo 2009 - 2017

Tabla 1: prevalencia y tasa aparente de procreo para el partido de Chascomús en el periodo 2012 - 2014

					Tasa aparente de procreo	
Año	Prevalencia establecimientos	Total establecimientos	Prevalencia individual	Total de toros	Establecimientos Positivos	Establecimientos Negativos
2012	12,00	275	3,56	3785	73,90	75,20
2013	14,83	263	5,65	4308	61,20	66,50
2014	25,84	273	7,38	4118	70,30	75,70

Discusión y conclusiones

En un contexto donde aún muchos campos no realizan diagnóstico, el estancamiento de las prevalencias se relaciona claramente con la falla en los protocolos de quienes intentan el control. Los resultados reproductivos confirman el costo de esta enfermedad, sin dejar de lado otras causas de pérdida incluyendo campilobacteriosis, que no se considera en este artículo.

Bibliografía

1. Campero C.M., Catena.M.C., Medina D., (1986) Caldo infusión hígado, para el cultivo de *Tritrichomonas foetus*. Vet.Arg. 3 80-81.
2. Laboratorio Azul “Noticias” (1987) III Jornadas de Actualización y análisis.
3. Martinez, A., (1994) “Situación actual de Trichomoniasis, Campylobacteriosis y Brucelosis.” VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias Buenos Aires Noviembre de 1994
4. Sánchez R.O., Sanabria R.E.F, Romero J.R, Travería G. Ramírez B., Frecuencia de Tetratrichomonas sp. y otros flagelados en toros de la zona deprimida del salado (provincia de Buenos Aires-Argentina) 12º International simposium of the World Association of Diagnostic Laboratories (WADL) Montevideo Uruguay 16-19 de noviembre de 2005. resumen. Nº183

E19- IMPACTO DE LAS ENFERMEDADES VENÉREAS EN UN ESTABLECIMIENTO DEL ESTE DE LA PROVINCIA DE FORMOSA

P.A. Zimmer*, J. J. Gait **, P. Etchepare**
*AER-INTA Formosa **Actividad privada

Introducción

La tricomonosis bovina, es producida por un protozoario *Trichomona foetus*, en cambio la campylobacteriosis es producida por una bacteria *Campylobacter fetus, subsp venerealis* y *fetus*. Ambas enfermedades son asintomáticas en los machos, los agentes se alojan en las criptas prepuciales y mucosa peneana. En las hembras afectan principalmente la vagina y el cuello uterino, produciendo: infertilidad transitoria, mortalidad embrionaria, abortos, piómetras y momificaciones. Las enfermedades venéreas de los bovinos, pueden producir pérdidas en el porcentaje de preñez entre 15 % y 25 %, pudiendo ser superiores cuando se presentan en forma conjunta. En el rodeo, se observa repetición de celo, desplazamiento de la preñez, disminución de porcentaje de preñez, y abortos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de las enfermedades veneres establecimiento en un del este de la provincia de Formosa

Materiales y métodos

En un establecimiento de cría del este de la provincia de Formosa, se realizaron revisión clínica y raspados prepuciales, de toros de los toros en el periodo 2016, 2017 y 2018. Para calcular los índices de preñez y la distribución de las mismas, se utilizaron las planillas de servicio y de diagnóstico de preñez a través de palpación rectal. Ambas actividades fueron realizadas por los médicos veterinarios encargado de la sanidad y reproducción del establecimiento.

Resultados

En los cinco muestreos realizados en el 2016 se detectaron once muestras positivas a *C. fetus sp* y treinta y uno a *T. foetus.* En el 2017, once muestras fueron positivas a *C. fetus sp* y cuatro a *T. foetus*. De los muestreos realizados hasta la fecha en el 2018 se obtuvieron diecisiete muestras porsitivas a *C. fetus sp* y nueve a *T. foetus*, el dato de los muestreos puede observarse en la Tabla 1. La distribución de la preñez fue estimada para el servicio de primavera 2015-2016, encontrando una distribución de 45% cabeza, 24% cuerpo y 31% cola, y una merma tacto parición de entre el 10-18% dependiendo del lote (Figura1).

Tabla 1: Número de muestras de raspados prepuciales, número de muestras positivas a *Campylobacter fetus sp* y *Trichomona foetus* durante el 2016, 2017 y 2018.

	Muestreo 2016					Muestreos 2017					Muestreo 2018			
	07-mar	31-mar	15-abr	03-may	09-ago	07-mar	20-mar	06-jul	14-sep	11-nov	15-mar	20-abr	23-may	22-jun
Muestras analizadas	166	158	149	137	203	195	180	232	185	177	190	185	165	160
*Campylobacter fetus sp**	3	5	3	0	0	0	3	0	6	2	0	14	1	2
*Trichomonas foetus***	9	14	8	0	0	0	0	0	2	2	0	5	4	0

Técnicas utilizadas para el diagnóstico: *Inmunofluorescencia directa **Cultivos

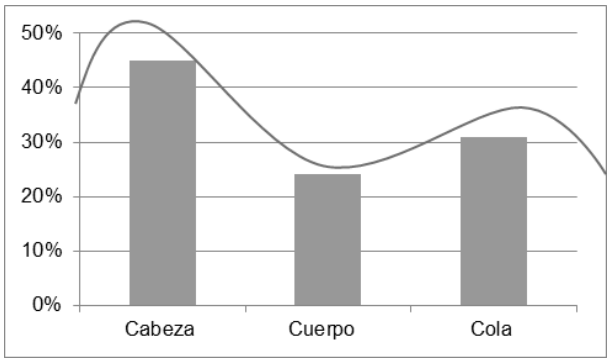


Figura 1: Distribución de la preñez del servicio de primavera 2015-2016, expresada en porcentajes (%) y clasificadas como cabeza, cuerpo y cola.

Discusión y conclusiones

En los muestreos realizados durante los tres años de seguimiento, se detectó la presencia de las dos enfermedades, campylobacteriosis y tricomonosis bovina. Se observa que en la distribución de la preñez del servicio de primavera de 2015-2016, hay un 31 % de preñeces chicas (cola), siendo esta superior a la esperada (20 %) pudiendo ser las enfermedades venéreas, una de las causales de este desplazamiento. Si bien se realizaron cinco raspados en el año 2016, cuatro fueron a la salida del servicio de primavera 2015-2016 y uno previo al servicio primavera 2016-2017, los dos últimos raspados fueron negativos a ambas enfermedades, sin embargo, el tiempo trascurrido entre ambos y la incorporación de nuevos animales en el último muestreo, podrían ser factores que permitieron la permanencia de la enfermedad. En los muestreos realizados en 2017 y 2018 se observa que en la primera toma de muestras no se detectan positivos, en ambos periodos en muestreos a partir de la segunda muestra se comienzan a detectar toros positivos. Si bien el presente trabajo no contemplo el estudio de otras enfermedades que pueden afectar los índices de merma preñez destete, podemos concluir que las enfermedades veneres impactan negativamente en la cría, ya que se reduce el número de terneros, produce un desplazamiento de las preñeces (disminución de terneros cabeza) y aumento en los costos de sanidad y reposición de toros.

Bibliografía

Campero, C.M., 2002, Eficiencia productiva del rodeo de cría. Rev. Idia XXI 2, 127-131.
Benítez, D.F, Sosa, C.G. Importancia del diagnóstico rápido en enfermedades venéreas. Noticias y Comentarios. N°525. ISSN N° 0327-3059.2015.

E20- IMPORTANCIA DE LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN FRIGORÍFICOS OVINOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS

G. Bernasconi[2,4], E. Falzoni[1]; S.Barandiaran[1], J.Marfil[3], M. Zumárraga[3], M. Martínez Vivot[1]
[1]Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y [2]Producción de Ovinos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.[3]Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA, Castelar.[4]SENASA
gbernasconi@fvet.uba.ar

Introducción. La Tuberculosis Bovina (TBB) es una zoonosis causada por *Mycobacterium bovis*, endémica en la República Argentina y con mayor prevalencia en áreas lecheras del país. No obstante afecta a los animales domésticos y salvajes (cerdos, ovinos, caprinos, camélidos, etc). Dicha enfermedad está regulada bajo la Resolución SENASA 128/2012, en donde contempla, entre otras consideraciones, la obligatoriedad de la tuberculinización en los ovinos de tambo y cabaña de reproductores. Asimismo el SENASA, a través de los planes de control y erradicación, establece los lineamientos a seguir para mitigar el impacto que produce esta enfermedad en la producción bovina y en la salud pública; y lograr, mediante el trabajo mancomunado de todos los sectores privados, los profesionales veterinarios y el Estado, el control de la enfermedad. Si bien en la Argentina es muy rara la Tuberculosis en los ovinos de majada general (no así en bovinos y caprinos), no hay muchos trabajos que documenten dicha ausencia. Dentro de este marco, se aprecia fundamentar los registros obtenidos para demostrar la importancia que cobra la vigilancia epidemiológica en faena, en los ovinos.

Objetivo. Confirmar por métodos bacteriológicos, moleculares e histopatológicos el diagnóstico de TBB en muestras de ovinos faenados en frigoríficos bajo inspección de SENASA de la Regiones Patagonia Sur y Buenos Aires Norte.

Materiales y métodos. Se procesaron 124 muestras de órganos y linfonódulos mediastínicos y mesentéricos de ovinos procedentes de dos establecimientos de la localidad de Esquel, provincia de Chubut; tres de la localidad de Río Gallegos, provincia de Santa Cruz y uno de la localidad de General Belgrano, provincia de Buenos Aires. Las muestras fueron decontaminadas por el método de Petroff y sembradas en los medios de Stonebrink y Lowënstein Jensen a 37°C. Luego de 8 semanas, sólo hubo un aislamiento bacteriano. Se realizó la extracción de ADN y se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) basada en la amplificación de la secuencia de inserción IS*6110* presente en las micobacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* al cual pertenece *M. bovis.* La tipificación se llevó a cabo por la técnica molecular de Spoligotyping. Además, se realizaron estudios histopatológicos de muestras fijadas con formol al 10%. Se procesaron tacos parafinados de los que se hicieron cortes de 5 µ de espesor que fueron posteriormente coloreados con Hematoxilina/Eosina y Ziehl Neelsen.

Resultados
Luego de 8 semanas de incubación a 37° C en medios de Stonebrink y Lowënstein Jensen, sólo hubo crecimiento de escasas colonias en una sola muestra correspondiente a un pulmón de cordero procedente del Frigorífico de Buenos Aires. La identificación por PCR arrojó un resultado positivo a TBB por amplificación de la secuencia de inserción IS*6110,* como perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis;* y por el método de Spoligotyping se pudo tipificar como patrón 34 de la base de datos de INTA (SB0140 en la base de datos internacional) frecuente entre los bovinos y otras especies animales en la República Argentina.
Los cortes histopatológicos coloreados con Ziehl Neelsen, no revelaron la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes.

Discusión y conclusiones.En una de las 124 muestra de los órganos procesados por métodos bacteriológicos, moleculares e histopatológicos, pudo aislarse e identificarse *M. bovis*, tiificado por Spoligotyping como patrón 34 (SB0140). Dicha muestra provenía del pulmón de un cordero de un establecimiento de la provincia de Buenos Aires. Es así, que debido a este hallazgo, consideramos que la vigilancia epidemiológica en frigoríficos faenadores de ovinos, junto al cultivo, los métodos moleculares y la histopatología para confirmar o descartar tuberculosis, adquiere suma importancia; ya que mediante el *trace back,* se podrían evidenciar aquellos establecimientos libres de esta enfermedad sin tener la necesidad de tuberculinizar a la majada general.
El Plan Nacional de Tuberculosis contempla la elaboración y ejecución de Programas Regionales, que podrán ser de control, erradicación y/o zonas libres, en donde se utilizará un sistema de vigilancia epidemiológica (VE) en faena. Este sistema incorpora la información provista por la inspección veterinaria en frigoríficos y mataderos, a efectos de lograr la caracterización epidemiológica y la trazabilidad del establecimiento de origen de los animales detectados con la enfermedad en el país. El sistema de vigilancia ha permitido, no sólo identificar aquellas unidades productivas en los que se detecta la presencia de la enfermedad, sino que a través de la interpolación con el sistema de gestión sanitaria (SIGSA), se ha podido observar en qué tipo de explotaciones se están encontrando casos de tuberculosis bovina y de esa manera caracterizar aún más el comportamiento de la enfermedad. La notificación al sistema por parte de los servicios veterinarios en los frigoríficos se produce al detectar animales con lesiones compatibles con TBB. Las Oficinas Locales del SENASA, poseen una base de datos, que permite ubicar al productor, saber la composición de su rodeo y movimientos por medio del SIGSA.
Las notificaciones detallan el nombre y número oficial del frigorífico donde se faenó la tropa, fecha de la faena, RENSPA de origen, Nº de DT-e, número de animales que componen la tropa, categoría de los animales con lesiones.
Esto resulta de suma importancia ya que las implicancias en la salud pública varían según la especie involucrada en el caso; mientras que la genotipificación contribuye al conocimiento de la posible fuente de infección y cadena epidemiológica de la transmisión del microorganismo.

Bibliografía
-Torres, P. (2006) Vigilancia Epidemiológica: “Importancia de la detección en faena de la tuberculosis bovina" V Congreso Argentino de Zoonosis y I Congreso Panamericano de Zoonosis, 2006. Libro resúmenes.p118. Revista La industria Cárnica Latinoamericana N°141.2006. Premio APTA/RIZZUTO 2006.
-Zumárraga, M.; Martin, C.; Samper, S. Alito, A.; Latini, O.; Bigi, F.; Roxo, E.; Cicuta, M.; Errico, F.; Castro Ramos, M.; Cataldi, A.; Soolingen, D.; Romano. M. (1999). “Usefulness of Spoligotyping in Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*-Related Infections in South America” Journal of Clinical Microbiology 1999.
-Garbaccio, S.; Delgado,Ff.; Saldaño, S.; Romano, M.; Rabasa, A.; Aznar,N.; Romero, G.; Rossetti, C.; Cisterna,Cc..; Samartino, L (2008). “Relevamiento de enfermedades de interés en salud pública en pequeños rumiantes de Tucumán, Argentina”. 3º Congreso Latinoamericano de Zoonosis, VI Congreso Argentino de Zoonosis.2008.

IMNUNOLOGÍA

I1- DESARROLLO DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO INDIRECTO (ELISAI) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS DE LOS BOVINOS: RESULTADOS PRELIMINARES

V. Vanzini[1]; S. Elena[2], N. Aguirre[1]; B. Valentini[1], A. Russo[3], S. T. de Echaide[1]
[1] INTA EEA Rafaela, Ruta 34 Km. 227, (2300) Rafaela, Santa Fe.
[2] SENASA, Talcahuano 1660, (1640) Martinez, Buenos Aires.
[3] Centro de Investigaciones y Transferencia, CIT, CONICET, Formosa.
Correo-e: vanzini.victor@inta.gob.ar

Introducción

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa producida por bacterias del género *Brucella*, que eventualmente se transmite al hombre constituyendo una zoonosis de relevancia mundial (García Carrillo, 1987).

El diagnóstico serológico de la brucelosis bovina aplicada a muestras de suero sanguíneo incluye a las pruebas con antígeno tamponado en placa (BPA) y ELISA indirecto (ELISAi) como pruebas tamiz; y la seroaglutinación en Tubo (SAT), 2-Mercaptoetanol (2-Me), Polarización Fluorescente (FPA) y ELISA competitivo (ELISAc) como confirmatorias y Fijación de Complemento (FC) como prueba confirmatoria de referencia (SENASA, Res. 438/2006, Col. 23/2007).

En Argentina, en la década de los 90, diferentes grupos de trabajo (INTA, CONEA) validaron las pruebas de ELISA indirecto y de competición desarrollados en la CFIA, Canadá (Nielsen *et al*., 1996). El ELISAi basado en el sLPS (lipopolisacárido liso) de *B. abortus* S1119-3 como antígeno y el anticuerpo monoclonal (AcM) anti-IgG_1 bovina (M23) conjugado con peroxidasa, se implementó en el país para el diagnóstico de brucelosis bovina con la asistencia del Dr. Nielsen.

La prueba ELISAi aplicada a muestras de suero sanguíneo e individuales de leche y muestras mixtas del tanque colector de leche, resultaron altamente sensibles y específicas (Vanzini *et. al*., 1998, 2001) y fueron aprobadas por el SENASA (Res. 438/2006). Ante la falta de disponibilidad de los reactivos, en la EEA–Rafaela se realizó la producción de antígeno sLPS en conjunto con el SENASA y se desarrolló un AcM anti IgG_1. Se describen los resultados preliminares de la evaluación de la prueba ELISAi aplicada a muestras de suero sanguíneo.

Materiales y métodos

Las muestras de suero sanguíneo negativas (n=364) se obtuvieron de vacas mayores de 3 años vacunadas con la vacuna de *B. abortus* C19 entre los 3 a 8 meses de edad (SENASA Res. 150/2002) procedentes de establecimientos libres de brucelosis en los últimos 9 años. Las muestras positivas (n=207) se obtuvieron de establecimientos con antecedentes de brucelosis (abortos y/o aislamiento). Todas las muestras de suero fueron analizadas por las pruebas BPA y FC.

La extracción y purificación del sLPS a partir de la *B. abortus* S1119-3 fue realizada siguiendo el protocolo de la OIE (2017).

El AcM P8D8D10G11, fue obtenido luego de un plan de inmunización en ratones BALB/c con IgG_1 bovina (PBP003, BioRad) siguiendo el método descripto por Goding (1993).

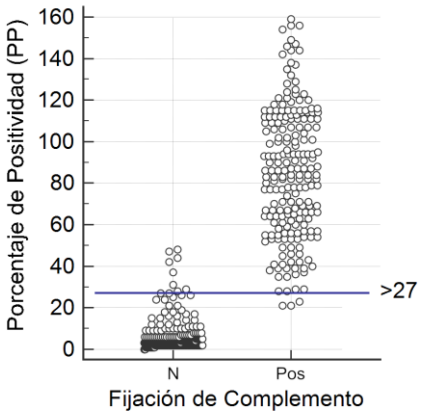
El ELISAi utiliza como antígeno el sLPS inmovilizado en una matriz de polipropileno; un AcM anti-IgG_1 conjugado con peroxidasa y agentes catiónicos quelantes EDTA y EGTA para reducir las reacciones inespecíficas. Las muestras de suero problema y controles se analizaron por duplicado. Se diluyeron 1:50 en solución tampón fosfato+Tween (PBST) con el agregado de EDTA–EGTA (0,015M). En cada placa se incluyeron un suero control positivo fuerte (C++), un positivo débil (C+), un negativo (C–) y PBST (Cc). Para visibilizar la reacción se utilizó ABTS+H_2O_2 en solución citrato/ácido cítrico. La reacción se evaluó en forma dinámica en un espectrofotómetro para placas con filtro de 405 nm realizando una lectura inicial a los 4 minutos de incubación para calcular el tiempo de desarrollo y efectuar la lectura final, siguiendo el protocolo descripto por Vanzini, *et al.* (1998). Los resultados se expresaron en % de positividad (PP) respecto del C++ según la siguiente fórmula: PP=DO muestra ÷ DO C++ x 100.

Para determinar la sensibilidad, especificidad y punto de corte se realizó un análisis ROC (IC 95%) con el programa MedCalc®. Para la concordancia entre FC y ELISAi se utilizó el índice kappa.

Resultados

El punto de corte fue ≥ 27% con una sensibilidad de 98,6% ±2,8 y una especificidad del 97,8%±2,1 (IC 95%). El área bajo la curva fue del 99,8% (P< 0,001). La concordancia entre FC y ELISAi mostró un índice Kappa de 0,959 (0,934-0,983). Hubo 3 resultados falsos negativos y 8 falsos positivos.

Figura 1: Distribución de los % de positividad obtenidos por ELISAi (punto de corte > 27%) en muestras de suero positivas y negativas a FC.



Discusión y conclusiones

Los resultados preliminares indican que ELISAi basado en sLPS y el AcM P8D8D10G11 de producción nacional, sería una herramienta adecuada para ser aplicada en la campaña de control y erradicación de la brucelosis bovina en Argentina.

La eficiencia de la prueba fue similar a la obtenida con los reactivos de la CFIA (Vanzini *et al*., 1998). Se podría disponer en el país de una prueba objetiva, rápida y automatizable, para analizar gran número de muestras por día y operador.

Bibliografía

-C. García Carrillo., Brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. Off. Int. desEpiz, Paris, Francia, 1987,p. 303.

-J. Goding Monoclonal antibody: principles and practice. 3rd. Ed. San Diego, USA. Academic Press, Inc., 1993, pp. 1-485.

-K. Nielsen, P. Smith, D. Gall, B. Perez, C. Cosma, P. Mueller, J. Trottier, G. Cote, L. Boag, & J. Bosse. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. Vet. Microbiol. 52, 1996:165-173.

-OIE. Brucelosis. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. Capítulo 2.1.4, 2017:1-47. Versión 2016.

-V. Vanzini, N. Aguirre, C. Lugaresi, S. Torioni de Echaide, V. Gianre de Canavesio, A. Guglielmone, D. Marchesino, & K. Nielsen. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. Prev. Vet. Med. 36, 1998:211-217.

I2- COMPARACION ENTRE UN ELISA INDIRECTO EN SUERO Y UN ELISA EN LECHE PARA EL DIAGNOSTICO DE PARATUBERCULOSIS EN VACAS DE TAMBO: RESULTADOS PRELIMINARES

P.S.Sosa[1, 2], M.F.Alvarado Pinedo[1], L.A. Di Paolo[1], M.Jaureguiberry[1, 4], L.M.Peralta[1], M.A.Romero[1,3], G.E.Travería[1].
[1] CEDIVE. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP. Alvear y Salta (7139). Chascomús. Buenos Aires.[2] Beca doctoral Universidad Nacional de La Plata.[3] Beca doctoral Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC).[4] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
. Email: pedrososa041@gmail.com

Introducción

La paratuberculosis (PTBC) es una ileocolitis granulomatosa crónica de los rumiantes cuyo agente etiológico es el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), su período de incubación oscila entre 2 y 8 años, y la signología clínica incluye diarreas, edemas en zonas declives, caquexia y muerte. En bovinos de leche provoca grandes pérdidas económicas, en animales subclínicos se estima una pérdida del 16% por lactancia (Tiwari A. *et al.* 2008). Su vía de transmisión es fecal-oral, los terneros son los más susceptibles a la infección, la cual puede ocurrir al lactar de una ubre contaminada con materia fecal y, en menor medida, por la eliminación de la bacteria en calostro o en leche. Su control, por el momento, se basa en la detección y refugo de animales positivos a las pruebas diagnósticas que detectan la inmunidad celular y humoral, y el cultivo bacteriológico.

Este trabajo tiene como objetivo comparar los resultados entre el ELISA indirecto en suero sanguíneo, utilizado de rutina en el CEDIVE y un ELISA indirecto en leche, de mayor practicidad en vacas de tambo, confirmando la infección mediante el cultivo de materia fecal.

Materiales y métodos

Se estudiaron 11 vacas Holando Argentino, pertenecientes a un tambo con PTBC endémica. Se colectaron muestras de sangre de la vena coccígea, 50 mL de leche de los cuatro cuartos y materia fecal. Estos animales fueron seleccionados de acuerdo a resultados serológicos 4 meses previos al ensayo, de aproximadamente 300 muestras, siendo los animales estudiados 8 positivos y 3 negativos (ver tabla 1). Las muestras de suero fueron analizadas según el protocolo para un ELISA indirecto desarrollado en el CEDIVE descripto por Travería (2003). Se consideraron positivas aquellas densidades ópticas (DO) con un porcentaje de positividad superior al 65% con respecto al control positivo. Las muestras de leche se centrifugaron a 2000 rpm 25 minutos, se retiró la capa de crema, para usar la fase acuosa. Las condiciones de trabajo se definieron previamente de la siguiente manera, dilución de las muestras 1:10, dilución del antígeno 1:960 y el conjugado 1:1250. Para ambos ELISA se utilizó antígeno de *M. avium* subsp. *avium* lisado a 40 kpsi en un disruptor celular (Constant cell) y como conjugado Anti IgG bovina (Sigma®).

Las muestras de materia fecal se descontaminaron por el método de Cornell o de la doble incubación. Se sembraron en medio líquido M7H9C, suplementado con micobactina (Whittington *et al*. 2013). Estos cultivos se observaron semanalmente mediante tinción de Ziehl Neelsen, durante un periodo no menor a 2 meses**.** Se consideraron positivos aquellos cultivos en los que se encontraron bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) agrupados en forma de ovillos.

Las 11 muestras de leche con sus respectivos sueros y cultivos se analizaron estadísticamente mediante una regresión lineal simple, utilizando el software Statgraphics Centurión XVI. II.

Resultados

En la tabla 1 se presenta un resumen de los resultados de ELISA en leche y suero, y preliminares del cultivo.

La regresión lineal simple, demostró una relación positiva entre DO de leche y DO de suero (Figura 1), con un coeficiente de correlación de 0,695. El valor de p= 0,017 en tabla ANOVA, indica una relación estadísticamente significativa con nivel de confianza del 95%. entre las DO en leche y los cultivos, la regresión es positiva, con un coeficiente de correlación de 0,752, lo que indica una asociación moderadamente fuerte entre ambas variables.

Tabla 1 Resultados de los ELISA en suero y leche expresados en DO, resultados parciales de cultivos en materia fecal. Y días en leche (D.E.L) al momento del 2° muestreo.

MUESTRA	D.E.L	DO SUEROS		DO LECHES	CULTIVO
		1°ELISA	2°ELISA		
1	89	906	429	211	en incubación
2	27	819	387	226	BAAR+
3	155	355	291	329	en incubación
4	157	816	533	321	en incubación
5	85	872	550	321	en incubación
6	80	939	765	625	BAAR+
7	322	783	569	928	BAAR+
8	80	1073	611	662	BAAR+
9	344	484	556	699	BAAR+
10	554	793	581	674	BAAR+
11	300	300	263	141	en incubación

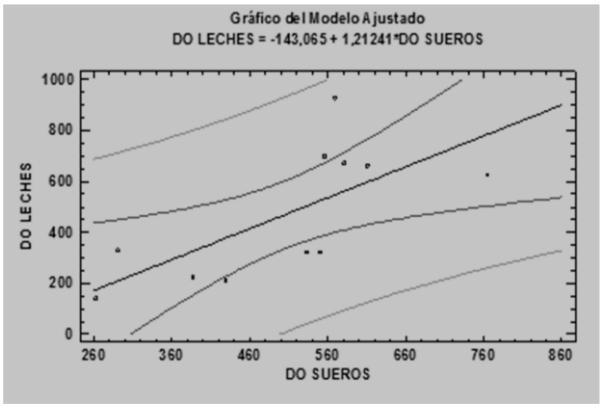


Figura 1. Regresión lineal calculada para los resultados de DO de los ELISA en suero y en leche con el software Statgraphics Centurión XVI. II. Se puede observar la relación positiva.

Discusión y conclusiones

Si bien los resultados hasta el momento son alentadores, al haber demostrado un buen nivel de correlación entre las DO obtenidas en las pruebas de ELISA en leche y en suero; se necesita analizar un mayor número de muestras para confirmar los resultados obtenidos y determinar las características operativas de la técnica como la sensibilidad, especificidad, su relación con el cultivo de materia fecal y la variación de las DO durante la lactancia, lo cual debería tenerse en cuenta al momento de interpretar los resultados (Nielsen *et al*.,2002). Podemos destacar que la muestra en leche tiene como ventaja práctica, su fácil obtención al momento del ordeñe, sin afectar la producción y la rutina del tambo con los encierres.

Bibliografía

- Tiwari A et. al Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with subclinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. Can Vet J. 2008 Jun;49(6):569-76.
- Whittington RJ, Whittington AM, Waldron A, Begg DJ, De Silva K, Purdie AC, Plain KM. 2013. Development and Validation of a Liquid Medium (M7H9C) for Routine Culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to Replace Modified Bactec 12B Medium. Journal of Clinical Microbiology. 51(12): 3993–4000. doi: 10.1128/JCM.01373-13
- S. S. Nielsen*, Y. T. Groöhn,† and C. Enevoldsen‡. Variation of the Milk Antibody Response to Paratuberculosis in Naturally Infected Dairy Cows. J. Dairy Sci. 85:2795–2802 © American Dairy Science Association, 2002.
- The ELISA Guidebook By John R. Crowther.The International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.Methods in molecular biology TM. 2002.

I3- EVALUACIÓN PRELIMINAR DE UN TEST DE POLARIZACIÓN DE LA FLUORESCENCIA EN MICROPLACAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS PORCINA

S.E. Gutiérrez[1,3], A.R. Bence[2,4], S.M. Estein[2,3]
[1] Laboratorio de Virología [2] Laboratorio de Inmunología. CIVETAN. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Pinto 399. Tandil (7000). [3]CONICET. [4]CIC.

segutier@vet.unicen.edu.ar

Introducción

Los test serológicos constituyen herramientas esenciales para el diagnóstico y control de la brucelosis porcina. Las pruebas prescriptas por la OIE y el SENASA para esta especie, han sido desarrolladas para el diagnóstico en la especie bovina, y luego adaptadas para su uso en el porcino. Si bien permiten la identificación de piaras infectadas, ninguna de estas pruebas aisladas es útil en todas las situaciones epidemiológicas, presentando limitaciones en el diagnóstico de animales individuales.

Las pruebas de referencia con fines de comercialización internacional son un ELISA indirecto y uno competitivo. La aglutinación con antígeno tamponado (BPA) y el test de Rosa de Bengala (RB) son pruebas alternativas con fines de detección o pruebas para el estudio de piaras completas[1]. La prueba de polarización de la fluorescencia ejecutada en tubos (FPAt) ha sido validada para el diagnóstico presuntivo de brucelosis porcina con una sensibilidad de 93,5% y una especificidad de 97,2%[2]. En ausencia de suero estándar internacional para brucelosis porcina, debe establecerse el umbral en la población de destino con técnicas de validación adecuadas[1]. La FPA resulta una técnica conveniente debido a su precisión, facilidad de ejecución y relativo bajo costo.

El **objetivo** de este trabajo fue realizar una evaluación preliminar del ensayo de FPA en microplacas (FPAm) para el diagnóstico presuntivo de la brucelosis porcina.

Materiales y métodos

Se utilizaron 524 muestras de suero porcino de distintas categorías: 89 muestras provenientes de un establecimiento que presentó serología negativa a brucelosis en la totalidad del plantel en 2 muestreos anuales durante 7 años, y las restantes provenientes de 9 establecimientos con antecedentes clínicos o serológicos de la enfermedad. Las pruebas de BPA y FPA en tubo se realizaron e interpretaron de acuerdo a los procedimientos establecidos por SENASA. Para la variante de FPA en microplacas se probaron diferentes diluciones del suero porcino (1:25, 1:10 y 1:5) y se utilizó el kit para diagnóstico de brucelosis por FPA (Laboratorio Biológico de Tandil). La lectura de FPA se realizó con un lector multimodo de microplacas (DTX 880, BeckmanCoulter) y se expresó en unidades mP. Se analizaron 8 muestras en 8 ensayos independientes y se determinó la variabilidad interensayo. Se realizó un análisis ROC (receiver operator characteristic) para determinar el valor de corte del ensayo que maximice el índice de Youden (sensibilidad + especificidad -1).

Resultados

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando el suero porcino a la dilución 1:5. Los valores de mP obtenidos con la prueba en microplacas (dilución 1:5 del suero) fueron significativamente inferiores a los obtenidos con la prueba en tubo (dilución 1:25) para las muestras negativas ($p< 0,0001$), mientras que no se observaron diferencias significativas entre los 2 métodos para las muestras positivas ($p> 0.05$).La variabilidad interensayo medida para 8 muestras (3 negativas, 3 positivas y 2 positivas débiles) en 8 experimentos independientes fue de 11,1 ± 2,28 unidades mP, siendo el coeficiente de variación de 14% en promedio para las muestras analizadas.

El análisis ROC realizado con los valores de mP obtenidos para 89 muestras de suero negativas y 74 muestras positivas a BPA y FPAt resultó en un valor de corte de 59,3 mP, con un índice de Youden de 0,914 (sensibilidad= 94,6% y especificidad= 96,6%)

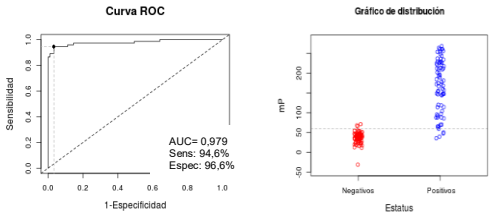


Figura 1. Curva ROC (izquierda) y gráfico de distribución (derecha) de los valores de mP para 89 muestras negativas de un establecimiento libre y 74 muestras positivas por BPA y FPAt.

De 363 muestras de animales provenientes de piaras con antecedentes serológicos y/o clínicos de infección, categorizadas como negativas por BPA y FPAt, analizadas por FPAm, 328 (90,4%) dieron valores de mP por debajo del valor de corte establecido por el análisis ROC, mientras que 35 muestras (9,6%) resultaron con valores por encima de 59,3mP.

Discusión y conclusión

La validación de la prueba FPAt con gran cantidad de sueros porcinos provenientes de una región libre, estableció un valor de corte de 84mP[2]. Este valor ha sido adoptado por el SENASA para nuestro país[3]. En otro estudio[4], utilizando la prueba en microplacas, se evaluaron sueros de distintas categorías epidemiológicas, incluyendo sueros con falsa reacción serológica positiva, y se encontró que el valor de 99,3mP fue el que mejor separó las poblaciones de infectados y no infectados.

El valor de corte obtenido en este trabajo fue considerablemente inferior al establecido en otros estudios. Esto se debe, por un lado, a la dilución de suero utilizada. Además, el menor nivel de reacción observado en los sueros del establecimiento certificado negativo influyó directamente en el valor de corte obtenido en el análisis ROC. El mayor nivel de reactividad observado en los sueros categorizados como negativos por BPA y FPAt en establecimientos con antecedentes serológicos y/o clínicos de infección determinó una menor performance diagnóstica del FPAm en estas condiciones epidemiológicas.

Es necesario analizar una mayor cantidad de sueros negativos de otros establecimientos, para definir un valor de corte. Se resalta la necesidad de establecer un rango de incertidumbre para la prueba en microplacas, y posiblemente también para la FPAt, tal como se considera en la especie bovina, para obtener una performance aceptable en las condiciones epidemiológicas de Argentina.

Los autores agradecen al Laboratorio Biotandil S.R.L. la provisión de los antígenos y el análisis de las muestras mediante la prueba de FPA en tubo.

Bibliografia

1-Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.Chapter 2.08.05: Porcine Brucellosis. 2009.

2-Nielsen, K., Gall, D y cols. Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucelosis. Vet Microbiol 68: 245-253, 1999.

3-Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. 2009

4-McGiven, J.A., Nicola, A. y cols.An evaluation of the capability of existing and novel serodiagnostic methods for porcine brucelosis to reduce false positive serological reactions. Vet Microbiol 160: 378-386, 2012

I4- DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSIS EN PERROS: EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA *IN-HOUSE*

B.E.Alvarez[1], L.M. Campero[1, 2*], L.A. De Felice[1], J.M.Unzaga[1], M.C.Venturini[1]
[1]Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA) Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.
[2]CONICET. *lcampero@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

Neospora caninum es un parásito de vida intracelular que afecta a perros jóvenes y adultos. Entre los signos clínicos predominan los neurológicos y musculares caracterizados por parálisis ascendente y paresia del tren posterior (Dubey y Schares, 2006). Resulta esencial contar con pruebas de diagnóstico certero para contribuir al manejo y control de la enfermedad. Para el diagnóstico se pueden utilizar diferentes pruebas basadas en la detección de anticuerpos, siendo la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) la más utilizada en nuestro medio. Las pruebas de Enzimoinmunoensayo (ELISA), tienen elevado costo económico debido a que deben ser importados. Por ello, resulta importante desarrollar y evaluar pruebas diagnósticas elaboradas en el país. Debido a la ausencia de un *Gold-standard*, la evaluación de nuevas pruebas se debe realizar respecto a un "estándar relativo de comparación" (ERC) compuesto por sueros con resultados concordantes a 2 pruebas diagnósticas (Campero y col., 2015). El objetivo del presente trabajo fue evaluar una prueba de ELISA indirecta *in-house* elaborado con proteínas solubles de la cepa de referencia NC-1.

Materiales y métodos

Se seleccionaron 103 sueros de perros que fueron enviados para su diagnóstico al Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA). Los sueros fueron evaluados mediante la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos anti- *N. caninum* y anti-*Toxoplasma gondii* y con la prueba de Immunoblot (IB) para *N. caninum*. Para la prueba de IFI se utilizó un punto de corte de 1:50 hasta título final y para el IB se analizaron los sueros en una dilución de 1:100 (De Felice y col., 2016). Se registraron las reacciones hacia 5 antígenos IDAs con pesos relativos moleculares de 17, 19, 29, 30, 33 y 37 kDa, considerando positivo la reacción hacia 2 o más IDAs. De este modo se formó ERC compuesto por sueros que resultaron positivos y negativos a las dos pruebas mencionadas anteriormente (IFI e IB). La prueba de ELISA indirecta se realizó en placas de 96 pocillos sensibilizados con proteínas solubles totales de *N. caninum* de la cepa de referencia NC-1 (Polysorp-Immunon-Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU). Los sueros fueron analizados por duplicado a una dilución de 1:100. Las densidades ópticas (DO) se analizaron según el índice: (promedio DO muestra - promedio DO control negativo)/ (promedio DO control positivo - promedio DO control negativo) realizando la lectura a 492nm (filtro de referencia: 620 nm). Se determinaron las características diagnósticas de la prueba de ELISA *in-house* y se calculó el punto de corte más cercano al óptimo para la prueba de ELISA donde se buscaron los máximos valores de Sensibilidad (Se) y Especificidad (Sp) relativa utilizando un intervalo de confianza del 95% mediante el análisis ROC. El área bajo la curva ROC (AUC) se evaluó como: no informativa (AUC= 0,5), poco precisa (0,5 < AUC ≤ 0,7), moderadamente precisa (0,7 < AUC ≤ 0,9), altamente precisa (0,9 < AUC≤1) y prueba perfecta (AUC= 1). Adicionalmente, se calculó la concordancia entre el ERC y la prueba de ELISA mediante el índice kappa (k) (Epidat 3.1) considerando el grado de acuerdo como: pobre (k= 0,00), débil (k= 0,00–0,20), aceptable (k= 0,21–0,40), moderada (k= 0,41–0,60); muy buena (k= 0,61–0,80) y excelente (k ≥ 0,81).

Resultados

Los valores de Se y Sp relativas para la prueba de ELISA sobre los 101 sueros concordantes por IFI e IB fueron de 86% y 73%, respectivamente, utilizando un punto de corte de 0,52 (índice). El área bajo la curva fue moderadamente precisa con un valor AUC= 0,84 (0,76 a 0,91) en relación al ERC (Fig.1).

La concordancia entre el ERC y la prueba de ELISA evaluada resultó moderada con un valor kappa= 0,46.

Figura 1. Curva ROC de la prueba de ELISA con sueros del estándar relativo de comparación.

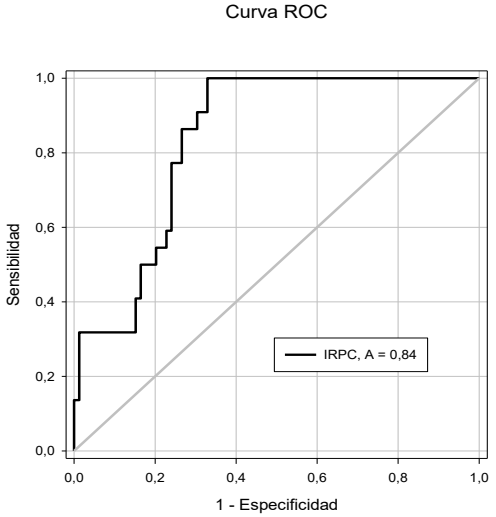


Tabla 1. Resultados de la prueba de ELISA en relación al estándar relativo de comparación (ERC).

	ELISA		
	Positivos	**Negativos**	**Total**
ERC			
Positivos	**19**	**3**	**22**
Negativos	**21**	**58**	**79**
Total	**40**	**61**	**101**

Discusión y conclusión

Se evaluó una prueba de ELISA con proteínas solubles totales para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* en perros. Para ello se conformó un panel de sueros del ERC previamente clasificados como positivos y negativos por las pruebas de IFI e IB. El valor de Sp de la prueba evaluada demuestra la detección de falsos positivos. Los 21 sueros positivos a la prueba de ELISA y negativos por IFI e IB (ERC), resultaron positivos a *Toxoplasma gondii* por IFI, lo que podría demostrar la presencia de resultados falsos positivos debido a reacciones cruzadas con el protozoo *T. gondii*. El uso de un antígeno específico podría optimizar los valores diagnósticos de la prueba. El antígeno NcSRS2 (p38) de *N. caninum* ha sido utilizado como antígeno diagnóstico en múltiples pruebas de ELISA en varias especies animales (Campero y col., 2015). Así, sería interesante evaluar en nuestro medio la prueba de ELISA con dicho antígeno con el fin de obtener una mejor performance diagnóstica.

Bibliografía

-Campero LM, Minke L, Moré G, Rambeaud M, Bacigalupe D, Moore P, Hecker Y, Campero CM, Schares G, Venturini MC. Evaluation and comparison of serological methods for detection of bovine neosporosis in Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 2015. 47:295-301. doi: 10.1016/j.ram.2015.07.002.

-Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. Vet Parasitol. 2006;140:1-3.

-De Felice L, Campero LM, Venturini MC, Unzaga JM. Detección de reacciones serologicas hacia antigenos inmunodominantes por Immunoblot y comparación con Inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de neosporosis y toxoplasmosis en perros. AAVLD. 2016 Pg. 120.

I5- EVALUACION DE UNA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA CON PROTEÍNA NATIVA P30 DE *TOXOPLASMA GONDII* PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS CAPRINA

ML. Gos [1,2], LM. Campero [1,2], G. Moré [1,2], MC. Venturini[1]
1. Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV-UNLP, La Plata, Bs. As. Argentina.
2. Comisión Nacional de investigaciones científicas y técnicas, Buenos Aires, Argentina.
mgos@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

La toxoplasmosis es una de las principales enfermedades infecciosas que causan abortos en caprinos en todo el mundo. El diagnóstico de esta enfermedad en cabras se realiza principalmente mediante la detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*, siendo la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) la prueba serológica más utilizada en el país. Resulta interesante el desarrollo de pruebas de ELISA para el diagnóstico de la toxoplasmosis en esta especie ya que permiten analizar un mayor número de muestras y una interpretación objetiva de sus resultados respecto a la IFI. El antígeno TgSAG1 de un peso molecular aproximado de 30 kDa (p30) de *Toxoplasma gondii* se ubica en la superficie de los taquizoítos y ha sido utilizado como antígeno diagnóstico en caprinos, sin embargo no ha sido evaluado localmente (1). Pueden existir variaciones epidemiológicas regionales y exposición a diferentes cepas de *T. gondii*, por ello la OIE recomienda validar localmente una prueba diagnóstica con sueros de animales naturalmente infectados de la región donde se va a implementar la misma (2). El objetivo de este trabajo fue evaluar una prueba de ELISA indirecto con la proteína nativa p30 de *T. gondii* (ELISA-p30) para el diagnóstico de la toxoplasmosis en caprinos naturalmente expuestos en nuestro medio.

Materiales y métodos

Se analizó un panel de 478 sueros caprinos con resultados concordantes a las pruebas de IFI e *Immunoblot* (IB) (dilución 1:100) en una proporción de 1 suero positivo cada 3 sueros negativos para *T. gondii.* Dicho panel de sueros conformó el Estándar Relativo de Comparación (ERC) necesario para la validación del ELISA-p30 en ausencia de un *gold standard* (2). Se sensibilizaron placas de ELISA (Polysorp-Immunon-Nunc, Thermo Fisher Scientific) con el antígeno nativo p30 (12ng/pocillo) obtenido mediante cromatografía de afinidad en 0,1M de bicarbonato de sodio (pH 8,3). Los sueros del ERC se diluyeron 1:100 en PBS-0,05% Tween 20-20% de suero equino. Se utilizó un conjugado anti-IgG de cabra con peroxidasa (Sigma-Aldrich) diluido 1:4000 en PBS-0,05% Tween 20-1% de suero equino seguido de la adición del cromógeno 100 µg/ml de 3,3´,5,5´-tetrametilbencidina y el sustrato 0,004% de peróxido de hidrógeno en una solución de 0,2 M de acetato de sodio y 0,2 M de ácido cítrico. La reacción se detuvo con el agregado de ácido sulfúrico (4N). Los valores de densidad óptica (DO) se midieron en un lector de ELISA (Thermo, Labsystems MS Multiskan) en modo dual con un filtro de 450nm (filtro de referencia 620nm). Las DO se analizaron según el índice relativo: (promedio DO muestra - promedio DO control negativo)/ (promedio DO control positivo - promedio DO control negativo). Mediante el análisis de curvas ROC (SigmaPlot 12.0) se determinó el punto de corte (índice) donde se alcanzaron los valores máximos de sensibilidad y especificidad relativa para la prueba ELISA p30 (IC95%). El área bajo la curva ROC (AUC) se evaluó como: no informativa (AUC= 0,5), poco precisa (0,5 < AUC ≤ 0,7), moderadamente precisa (0,7 < AUC ≤ 0,9), altamente precisa (0,9 < AUC≤1) y prueba perfecta (AUC= 1). Adicionalmente, se calculó la concordancia entre el ERC y la prueba de ELISA p38 mediante el índice kappa (k) (Epidat 3.1) considerando el grado de acuerdo como: pobre (k= 0,00), débil (k= 0,00–0,20), aceptable (k= 0,21–0,40), moderada (k= 0,41–0,60); muy buena (k= 0,61–0,80) y excelente (k ≥ 0,81).

Resultados

Se determinó que la prueba de ELISA-p30 para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii* en cabras fue altamente precisa con un AUC= 0,9788 (IC 95% 0,9602-0,9974). El punto de corte para la prueba de ELISA-p30 resultante del análisis ROC para una sensibilidad y especificidad relativa de 96% y 98% respectivamente fue de 0,2185 (índice). La concordancia entre el ERC y el ELISA-p30 fue casi perfecta (Tabla 1; k= 0,9381; IC 95% 0,9035-0,9726).

Tabla 1. Resultados del ELISA-p30 en relación con el ERC (IFI, IB).

		ELISA-p30		
		Positivos	Negativos	Total
ERC	Positivos	129	7	136
	Negativos	5	337	342
Total		134	344	478

ERC: sueros del estándar relativo de comparación con resultados concordantes a IFI e IB.

Discusión y conclusión

El ELISA elaborado con el antígeno nativo de superficie p30 (TgSAG1) en este trabajo resulta útil para la detección de anticuerpos anti- *T. gondii* en cabras naturalmente infectadas de nuestro país, ya que demostró una concordancia casi perfecta cuando se comparó con los sueros positivos y negativos a IFI e IB del ERC. También demostró tener alta precisión para discriminar muestras positivas de negativas y altos valores de sensibilidad y especificidad relativa. La importancia de utilizar la proteína p30 se debe a que es un antígeno inmunodominante de *T. gondii* considerándose como el principal antígeno de superficie para detectar anticuerpos específicos en cabras (3). Además, es importante su valor en el diagnóstico de infecciones causadas por diferentes cepas del parásito, dado que el antígeno p30 se encuentra conservado en muchas cepas de *T. gondii* (4). Debido a la buena *perfomance* diagnóstica de la prueba de ELISA-p30 evaluada, sería importante implementar su uso en el diagnóstico de la toxoplasmosis caprina en nuestro medio.

Bibliografía

1-Tzanidakis N y col. *Toxoplasma gondii* in sheep and goats: seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. Vet Parasitol. 2012;190 (3-4):340-8.
2- OIE. World Organization for Animal Health. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. En: Terrestrial Manual. 2014, capítulo 1.1.5, p. 15-16.
3- Vitor RWA, Ferreira AM, Fux B. Antibody response in goats experimentally infected with *T. gondii*. Vet Parasitol. 1999; 81: 259-260.
4- Ware PL, Kasper LH. Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. 1987; 55: 778.

I6- DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS BOVINA: COMPARACIÓN DE LA PERFORMANCE DIAGNÓSTICA DE DOS ELISAS (PROTEINA EXTRACTIVA VS RECOMBINANTE)

M. Martinez[1]; M. Rodriguez[2]; S. Grune Loffler[1-3]; L. Irazu[2]; V. Saraullo[1-3]; G. Romero[1]; J. Azpeitía[1]; B. Brihuega[1].
[1]Instituto de Patobiologia. Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.[2]ANLIS Dr. Carlos G Malbrán. INEI Departamento de Parasitología.[3]Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
martinez.mara@inta.gob.ar

Introducción

La leptospirosis es la zoonosis de mayor distribución mundial y es enzoótica en la Argentina. La detección precoz de animales con sintomatología compatible con leptospirosis, brinda un aporte considerable a las medidas de control de la enfermedad. El desarrollo de métodos de diagnóstico resulta de gran importancia. Nuestro objetivo fue comparar la performance diagnóstica de dos ELISAS; proteína extractiva Vs recombinante, desarrollados como prueba tamiz.

Materiales y métodos

Muestras de suero: Se trabajó con un panel de 166 sueros bovinos de la provincia de Buenos Aires.
Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT). Los sueros bovinos fueron evaluadas por MAT utilizando como antígeno una batería de 8 serovares diferentes de *Leptospira spp*.(*Leptospira interrogans* serovar Pomona Pomona, *L.i* serovar Canicola Hond Utrecht IV, *L. borgpetersenii* serovar Castellonis Castellon 3, *L. i.* serovar Wolffi 3705, *L. i.* serovar Hardjo Hardjoprajitmo, *L. i.* serovar Copenhageni M 20; *L. i.* serovar Tarassovi Perepelicin y *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa Moskva V.).
Se evaluó la performance diagnóstica de los dos ELISAs para diagnóstico de leptospirosis bovina tomando como Método de Referencia el método MAT (ensayo de microaglutinación). El primer ELISA utiliza como antígeno un extracto antigénico de Leptospira (Extracto) y el segundo utiliza una proteína recombinante (LipL 32). Se realizó un análisis de Curvas ROC siguiendo el procedimiento y las recomendaciones de la guía: CLSI document EP24-A2.
H0= AUC (EXTRACTO)=0.5 Rechazo H0
H0= AUC (LipL32)=0.5 Rechazo H0

Resultados

De los 166 sueros analizados, resultaron para MAT, 69 sueros positivos y 97 sueros negativos.

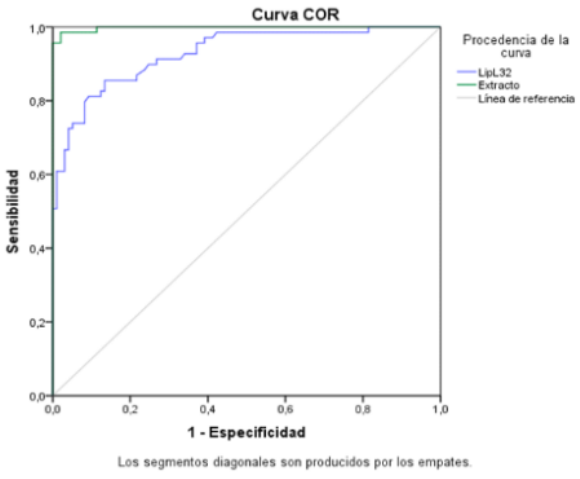


Figura 1. Curva ROC

Variables Resultado de contraste	Área	Error Típ. [a]	Sig. Asintótica [b]	Asintótico al 95 %	
				Límite inferior	Límite superior
Extracto	0.998	0.002	0.000	0.994	1.000
rLipl32	0.929	0.020	0.000	0.891	0.968

a=bajo el supuesto no paramétrico
b=Hipótesis nula: área verdadera=0.5

Cuadro 1. Área bajo la curva

Test para la diferencia de curvas:
H0= AUC (LipL32)= AUC (EXTRACTO)
Z= -3.825765586
p = 0.00007
La sensibilidad y especificidad diagnóstica para ambos ELISAS fueron: Extractiva 98.6% y 97.9% Vs rLipL32, 85.5% y 86.6%. (Fig. 1 y cuadro 1).
Las pruebas tienen distinto rendimiento diagnóstico en comparación con MAT, resultando la proteína extractiva más sensible y específica que la proteína recombinante LipL 32.

Discusión y conclusiones

Ambos ELISAS son métodos de tamizaje, desarrollados para la evaluación sanitaria de un rodeo. Los resultados obtenidos comparan la performance diagnóstica de dos ELISAS, uno desarrollado con proteínas nativas extractivas y el otro con una proteína recombinante. Ambos ELISAS resultaron óptimos para su uso en la Argentina, siendo el ELISA desarrollado con proteína nativa extractiva más sensible y específico que el desarrollado con la proteína recombinante LipL32. La obtención de proteínas nativas o recombinantes para su aplicación en el diagnóstico de la leptospirosis bovina en Argentina es de suma importancia. Actualmente existe una necesidad de desarrollo de nuevas técnicas para una rápida detección de la enfermedad.

Bibliografía

-CLSI. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
-Dawson, B., Trapp, R. G., & Dawson-Saunders, B. (1999). Bioestadística Médica. 2a ed., 3a reimp. México: Editorial El Manual Moderno. ISBN 968-426-751-7. Cap 13
-Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP24-A2 (ISBN 1-56238-777-4 [Print]; ISBN 1-56238-778-2 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2011.
-M. Martinez; S. Grune Loffler; C. Hartleben; M. Dominguez; M. Perez; G. Romero; C. Auteri; B. Brihuega. Inmunoreactividad de un extracto proteico de *Leptospira spp* vs proteinas recombinantes lipl32 y ligb25. XXI Reunión científico técnica Dr Bernardo Carrillo: Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnostico/ Raul Marin. 1ª edición. San Salvador de Jujuy: Universidad Nacional de Jujuy 2016. 182p ISBN 978-987-3926-15-0.

I7- EVALUACION DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO INDIRECTO (ELISAi) PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLOGICO DE LA BRUCELOSIS CAPRINA

R. Castaño Zubieta[1], M. Dunleavy[1], E. Maurizio[1], SM.Torioni de Echaide[2], V. Vanzini[2], CA. Rossetti[1*]
1 Instituto de Patobiologia, CICVyA, INTA. Los Reseros y N. Repetto s/n (1686) Hurlingham, Bs. As.
2 EEA Rafaela, CR Santa Fe, INTA. RN 34, Km 227 (2300) Rafaela, Santa Fe.
rossetti.carlos@inta.gob.ar

Introducción

La brucelosis caprina es producida por *Brucella melitensis*, y representa una problemática económica y de salud pública (zoonosis). El Plan Nacional de Control de Brucelosis Caprina (SENASA Resol 372/2017) se apoya en el diagnóstico serológico para caracterizar epidemiológicamente una zona, y en función de ello define la estrategia sanitaria correspondiente. Está demostrada la utilidad del ELISAi para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp. en sueros caprinos (Nielsen *et al*., 2005), pero la prueba no está disponible para su uso en Argentina. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un enzimoinmunoensayo indirecto (ELISAi) para el diagnóstico de la brucelosis en los caprinos.

Materiales y métodos

Se trabajó con 150 sueros caprinos provenientes de 16 majadas comerciales. Para la agrupación inicial de las muestras se evaluó la presencia de anticuerpos anti-brucella por la prueba de antígeno bufferado en placa (BPA; CDV, CABA), confirmada posteriormente por las pruebas de polarización fluorescente (FPA; Laboratorio Tandil, Bs. As.) o Fijación del Complemento (FC), las que se realizaron de acuerdo al manual de diagnóstico de brucelosis (Nicola y Elena, 2009).

Para el desarrollo del ELISAi se utilizó como antígeno el LPS de *B. abortus* 1119-3 (Laboratorio de Inmunología y Parasitología, EEA-Rafaela-INTA) adsorbido en placas de poliestireno de 96 pocillos fondo plano, y como anticuerpo secundario un policlonal anti-IgG caprina conjugada con peroxidasa (KPL, EUA). Los sueros se analizaron en una dilución 1/100, utilizándose como control positivo un suero fuertemente positivo a FC y como negativo un pool de sueros negativos a BPA. Los resultados se expresaron en unidades de ELISA (UE). Se calculó el porcentaje de coincidencias de resultados positivos y negativos entre las pruebas confirmatorias FPA/FC y el ELISAi. Para descartar el grado de acuerdo por azar se calculó el índice de concordancia Kappa de Cohen (K). El resultado se valoró de acuerdo a la escala de Landis y Koch.

Resultados

De acuerdo a los resultados obtenidos con las pruebas convencionales, los sueros fueron separados en positivos (n=50; incluye 10 sueros provenientes de cabrillas un mes post-vacunación conjuntival (1-2x10^9 UFC) con vacuna Rev.1) o negativos (n=100). La tabla 1 muestra la concordancia obtenida al comparar los resultados entre las pruebas convencionales y el ELISAi en desarrollo.

		Concordancia observada (CO)			Concordancia esperada por azar (CEA)		
		ELISAi			ELISAi		
Pruebas convencionales [BPA y (FPA/FC)]		+	-	Total	+	-	Total
	+	38	12	50	15	35	50
	-	6	94	100	29	71	100
Total		44	106	150	44	106	150
CO: 0,880 CEA: 0,569 K: 0,722							
Escala de Landis y Koch: pobre (K=0,0), leve (K=0,01-0,20), aceptable (K=0,21- 0,40), moderada (K=0,41- 0,60), sustancial (K=0,61-0,80), casi perfecta (K= 0,81-1,00).							

Discusión y conclusión

De acuerdo a la escala de valoración de Landis y Koch el grado de concordancia entre ambas pruebas se considera sustancial. Los resultados obtenidos, la sencillez del método y los valores de concordancia mostrados, resultan alentadores para continuar con la puesta a punto y validación del ELISAi para el diagnóstico serológico de la brucelosis caprina.

Bibliografía

-Cohen J. (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. Educ Psychol Meas, 20:37-46.
-Landis J.R., Koch G.G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics, 33:159-174.
-Nicola A, Elena S (2009). Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. SENASA. pp. 95.
-Nielsen K, Gall D, Smith P, Bermudez R, Moreno F, Renteria T, *et al*. (2005). Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *B. melitensis*. Small Rum Res, 56: 253-258.

I8- PRUEBA DE ANILLO EN LECHE UN HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA

C, Di Lorenzo; AP, Micelli Y B,Scuffi
Laboratorio de Inmunologia I parte. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata
cdilorenzo57@gmail.com

Introducción

La brucelosis bovina suele ser asintomática en animales de corta edad y en hembras no gestantes. Tras la infección, las hembras adultas gestantes presentan placentitis, que suele dar lugar a aborto. Incluso en ausencia de aborto, en la placenta, los líquidos fetales y las secreciones vaginales se produce una profusa excreción del microorganismo. La glándula mamaria y los ganglios linfáticos relacionados también pueden resultar infectados, y esto determinar la excreción de microorganismos con la leche. Las siguientes gestaciones suelen llegar a término, pero la infección uterina y mamaria reaparece, y por consiguiente la eliminación de microorganismos tanto en los productos del parto como en la leche. La colonización mamaria ubica a la leche como una importante vía de eliminación, la que se mantiene durante toda la lactación e incluso durante toda la vida del animal (Rodríguez y cols., 2005). La eliminación es máxima en los momentos posteriores al parto o aborto y mínima en los picos de la lactación, y aunque pueden pasar períodos largos sin eliminación ésta puede volver a producirse en cualquier momento. La Prueba del Anillo en Leche (PAL), también llamada Milk Ring Test (MRT) conocida inicialmente como Abortus Bang Ringprobe (ABR) fue diseñada por Fleishauer (1937). La prueba del anillo en leche (PAL) pertenece al grupo de pruebas indirectas empleadas en el Diagnóstico presuntivo de la brucelosis bovina . Se diseñó para identificar anticuerpos en leche. Los complejos antígeno anticuerpos formados, tras la adhesión del antígeno coloreado, son elevados a la superficie durante la incubación, por los glóbulos de grasa, formando un anillo coloreado en la superficie de la columna. Una sola prueba anual (PAL) es indicativa de diagnóstico presuntivo entre un 60 – 70 % de la infección, sin embargo cuando se realizan tres pruebas por año, cada 4 meses, se obtienen mejores resultados en la vigilancia de la enfermedad. La PAL, tiene una sensibilidad del 99% y una especificidad del 56%(9). (Bercovich, 1998) La PAL debe ajustarse para compensar el factor de dilución de las muestras de leche de tanque procedentes de rebaños grandes. La prueba del anillo en leche en nuestro país es usada ampliamente en Vigilancia Epidemiológica dado que permite controlar periódicamente la brucelosis en los establecimientos, contribuyendo a identificar rápidamente si la infección se ha reinstalado en el establecimiento lechero saneado o libre. Como componente de la vigilancia, se establece que todos los establecimientos procesadores de leche y fabricantes de productos lácteos deberán realizar seis (6) monitoreos anuales a sus tambos proveedores, mediante pruebas PAL en laboratorios de la Red. Aquel que detecte una prueba PAL positiva, deberá en forma inmediata comunicarle al productor y a su veterinario acreditado. Cuando se obtiene un resultado positivo, deben realizarse análisis de sangre en todas las vacas que aportan leche, El objetivo de este trabajo es presentar una experiencia de aplicación de la prueba PAL en un establecimiento lechero en saneamiento, como herramienta para la identificación de animales con colonización mamaria que no resultan reactores serológicos.

Materiales y métodos

Se trabajó en un establecimiento lechero en saneamiento, de 1160 animales en ordeñe , el mismo había comunicado un prevalencia del 4 % y pruebas PAL de tanque positivas , al momento de la consulta y nuestra intervención. Se realiza un muestreo serológico a las vacas secas y un muestreo pareado de sangre y leche a la totalidad de los animales en lactación. La secuencia de pruebas utilizadas y los antígenos para las muestras de suero y leche, fueron las recomendadas y aprobados por el SENASA. Brevemente en el caso del PAL, se realizó en leche tamiz, con 1 ml demuestra y 30ul de antígeno a cada una de las muestras previamente estacionadas 24hs. Y a las positivas se les realizaron diluciones de base 2 con leche negativa, hasta el título x32. Considerando como positivo a toda muestra con título igual o superior a x16. Se tabularon luego los resultados obtenidos por categoría, tipo de muestra y Prueba realizada.

Resultados

TABLA N 1 : Muestras de suero

	Animales	BPA	Confirmatoria*
Secas	350	2	neg
Ordeñe	1160	59	26

*criterios de interpretación recomendado por el SENASA.

Del análisis comparativo de los resultados serológicos y de leche, Ver Tabla 2 , se identificaron 3 animales con título de 1/16 en leche sin reactividad serológica, 2 con serología considerada positivo o reactor para segregar (ID1y2) y uno con serología insuficiente (ID3).

TABLA 2: Correlación entre los resultados del PAL individual y la serología

ID	BPA	SAT	2Me	PAL x16
1	pos	1/200	1/200	pos
2	pos	1/200	1/200	pos
3	pos	1/100	1/50	pos
4	neg	neg	neg	pos
5	neg	neg	neg	pos
6	neg	neg	neg	pos

Conclusiones

Resulta relevante para el saneamiento de la enfermedad la identificación de animales reactores a la prueba PAL que no presentan reactividad serológica. Si bien la confirmación individual para segregar un animal debe ser la serología, la utilización de la prueba PAL individual representa una herramienta más, que nos permite identificar los animales con colonización mamaria que no resultan reactores serológicos. La aplicación de la prueba de anillo en leche tiene la ventaja sobre las pruebas serológicas de que las muestras no son tomadas de una manera invasiva, por lo tanto no son un factor de stress para el animal, no generando pérdida de producción de leche u otro efecto indeseable como producto del manejo del momento de la toma de la muestra. La posibilidad de identificar animales no serológicamente reactivos, pero que sin embargo eliminan brucellas,spp por leche , resulta sin lugar a dudas , una oportunidad complementaria para el proceso de saneamiento y un efectiva medida en el área de la salud pública.

I9- UTILIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ELISA, COMPLEMENTARIA A LA INTRADERMOREACCIÓN, PARA EL SANEAMIENTO DE RODEOS LECHEROS BOVINOS CON TUBERCULOSIS

N. Griffa[1]; R.D Moyano[1]; M. N. Alonso[1]; F. Tonini[2]; P. Buraschi[2]; F. Martino[2]; M.I. Romano[1].
1. Instituto de Biotecnología. INTA Castelar. 2. Cooperativa La América.
griffa.natanael@inta.gob.ar; romanomariaisabel@inta.gob.ar

Introducción

La tuberculosis bovina (TBB), enfermedad producida por *Mycobacterium bovis*, es altamente prevalente, principalmente en los rodeos lecheros en nuestro país, y considerada una de las zoonosis más importantes (Magnano G. 2012, 1997; Garro C 2011). Los programas de erradicación de TBB están basados en la detección de los animales infectados y su eliminación del rodeo (Donnelly CA. 2015; SENASA/SAGPyA. 2012). La reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) por la inoculación intradérmica (IDR) de un derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD-B) es el diagnóstico oficial de TBB en nuestro país (Bernardelli A. 2007). Un inconveniente que se le atribuye a la IDR con PPDB, es que animales infectados, en determinados estados fisiológicos, dan falsos negativos a esta prueba. Trabajos recientes refieren que estos últimos animales, anérgicos a los test que miden respuesta celular, pueden detectarse utilizando pruebas que miden inmunidad humoral, como es el caso de la técnica de ELISA (Buddle BM. 2013; Casal C. 2014). También se han descripto falsos negativos a la PPDB por desensibilización (Coad M. (2010). Estos animales infectados no reaccionantes a la PPDB, son en algunos casos responsables de perpetuar la infección en los rodeos (Houlihan MG. 2008). De acuerdo a lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue utilizar un ELISA, validado previamente en nuestro laboratorio, como complemento de la IDR, para el saneamiento de rodeos lecheros en la provincia de Santa Fe.

Materiales y métodos

Se trabajó sobre 2 rodeos de la provincia de Santa Fe, a los cuales se les venía realizando IDR cada 4 meses y se eliminaban los animales reaccionantes. Se tomaron muestras de suero de todos los animales 15 días después de la inoculación de PPDB para realizar el ELISA. En uno de los establecimientos (B2) se realizó la eliminación de los animales positivos a IDR y ELISA. En el otro rodeo (G) solo se eliminaron los positivos a la IDR. Se utilizó el método de ELISA indirecto, previamente validado por nuestro grupo de trabajo, para el análisis de las muestras de suero. El muestreo se repitió cada 4 meses luego de la aplicación de PPDB. Los animales que fueron positivos a ELISA se siguieron al frigorífico para análisis de lesiones e histopatológico. Así como la identificación de la presencia de *M. bovis* por PCR.

Resultados

En la Tabla 1 se puede ver los resultados de los animales negativos a la IDR, positivos a ELISA. Además, se muestran los datos de prevalencia en el tiempo, antes de utilizar ELISA y después. Con el seguimiento de animales (ELISA +/IDR -) a frigorífico se vio que presentaban lesiones tuberculosas. En las cuales se identificó M. bovis por PCR.

ESTABLECIMIENTO	IDR+(I)	ELISA+(I)	ELISA+/IDR-	PREVALENCIA I	IDR+(F)	ELISA+(F)	ELISA+/IDR-	PREVALENCIA F
B2	18	33	33	6%	3	2	2	1%
G	9	44	44	3%	20	40	40	9%

Tabla 2 En la tabla se muestran los resultados en dos tiempos, tiempo 1 (I: donde se empezó a realizar la técnica de ELISA) y en el tiempo 2 (F: ultimo muestreo realizado). La prevalencia fue calculada con respecto a los valores de la prueba de referencia (IDR).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la importancia de aplicar técnicas complementarias a la IDR, ya que un alto porcentaje de animales positivos escapan a esta técnica. Además, resulta de suma necesidad aplicar técnicas de manejo adecuado dentro de los establecimientos tales como la alimentación de terneros con sustitutos lácteos, o evaluar animales eliminadores de micobacterias por leche para no utilizar la leche de esos animales para alimentar los terneros. También se evidencia la importancia de eliminación de animales positivos a cualquiera de las técnicas acá implementadas.

Bibliografía

-Magnano G. et al (2012) Evaluación de brucelosis y tuberculosis bovina en establecimientos de cría y tambo de la región centro de Argentina. J. Vet. Arg. Vol. XXIX - Nº 290
-Donnelly CA. et al (2015). Exploration of the power of routine surveillance data to assess the impacts of industry-led badger culling on bovine tuberculosis incidence in cattle herds. Vet Rec. sep 15. pii: vetrec-2015-103201. doi: 10.1136/vr.103201.
-Bernardelli A. (2007). Producción y control de tuberculina bovina y aviar Derivado Proteico Purificado (DPP). Coordinación de Bacteriología, Patología, Parasitología y Zooterápicos Dirección de Laboratorio y Control Técnico SENASA.
-Buddle BM. et al (2013). Evaluation of a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis from Milk Samples from Dairy Cows. Clin Vaccine Immunol., 20, 1812-1816.
-Casal C. et al (2014). Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. Veterinary Microbiology., 170, 342-351.

I10- PRUEBA DE POTENCIA DE TUBERCULINAS ELABORADAS CON MICOBACTERIAS AMBIENTALES AISLADAS DE MUESTRAS DE BOVINOS

F.Bresky[1]; M.A. Fiorentino[2]; C.Morsella[2]; L.Mendez[2]; B.Vasini Rosell[3]; ME.Eirin[3]; B.Alonso[4];I. Rodrigo[4]; M.Sanchez[4]; M. Zumarraga[5]; K.Cirone[2]; F.A.Paolicchi[2]

[1]CIC-UNMdP Mar del Plata, Bs. As, Argentina. [2]Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA EEA Balcarce, Bs. As., Argentina. [3]CONICET, Bs. As., Argentina. [4]SENASA, Martinez, Bs. As., Argentina. [5]Instituto de Biotecnologia, INTA Castelar.

bresky.florencia@inta.gob.ar

Introducción

La tuberculosis bovina (TBB) posee importancia no solamente por provocar enormes pérdidas económicas al sector ganadero de nuestro país, sino porque es una de las enfermedades zoonóticas de mayor relevancia a nivel mundial. La prueba diagnóstica oficial para la TBB es la prueba de tuberculina, la cual consiste en la inoculación intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD) de *M. bovis* capaz de inducir una reacción de hipersensibilidad retardada en los animales infectados, incluso en aquellos sensibilizados con micobacterias ambientales (MA) o no tuberculosas, por efectos de reactividad cruzada. El objetivo del trabajo consistió en la evaluación en cobayos de la potencia de diferentes preparaciones de PPD elaboradas a partir de MA aisladas de bovinos.

Materiales y métodos

Cepas utilizadas: se seleccionaron tres cepas de MA que incluyeron *M. fortuitum*, *M. phlei* y *M. porcinum*. Las primeras dos se aislaron de carcasas bovinas con lesiones detectadas en frigorífico[1] y la última de una muestra de leche de tanque de enfriado de tambo[2]. La caracterización molecular de los aislamientos se realizó mediante la secuenciación del gen que codifica la subunidad ribosomal 16S. Para la elaboración de las PPD a partir de las MA se utilizó la técnica previamente descripta por SENASA[3].

Evaluación de la actividad biológica de las PPD: Sensibilización y Prueba de Potencia: se utilizó el mismo criterio de evaluación descripto para la PPD bovina (PPDb)[3], con una prueba de actividad biológica (AB) en cobayos. Se sensibilizaron cobayos machos y hembras, de 300 g de peso, inoculando por vía intramuscular 0,5 mL de polvo desecado de micobacterias (2 mg de micobacteria disuelta en vaselina estéril). Se prepararon 3 lotes de 6 cobayos cada uno: lote A: sensibilizados con *M. fortuitum;* lote B: con *M. phlei* y lote C: con *M. porcinum.* A los 25 días pos-sensibilización, se inocularon vía subcutánea (SC) con tres diluciones: 1/100, 1/500 y 1/2500 de PPD realizada con la micobacteria homóloga correspondiente (1,5 mg/mL) y de PPDb (PPD de *M. bovis* AN5 a 1 mg/mL). Las inoculaciones se realizaron en 3 puntos por flanco distribuidos en un cuadrado latino, con el fin evitar la superposición de diluciones en el mismo punto de inoculación a lo largo de los distintos animales. En todos los lotes se utilizó como estándar la PPDb y el volumen administrado por punto de inoculación fue de 0,2 mL de PPD. A las 24 horas se realizó la lectura de los diámetros.

La valoración biológica de las sensitinas fue analizada mediante un ensayo de varianza donde se comparó la PPDb *versus* las PPD MA homóloga y el resultado se expresó en porcentaje de AB.

Resultados

En los cobayos sensibilizados con *M. fortuitum,* el porcentaje de AB fue de 0,1%, en los sensibilizados con *M. phlei* fue de 0,0%, mientras que en el grupo sensibilizado con *M. porcinum* fue de 10%. Los resultados de las lecturas obtenidas en los distintos lotes a partir de la prueba biológica se observan en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Resultados de la prueba de potencia realizada en cobayos sensibilizados con *M. fortuitum* (lote A).

Cobayo N°	Diluciones					
	PPD M. bovis			PPD M. fortuitum		
	1/100	1/500	1/2500	1/100	1/500	1/2500
1	15	11	9	3	3	3
2	18	15	11	8	7	7
3	17	11	11	8	6	6
4	14	11	8	8	3	3
5	14	9	10	2	3	2
6	13	10	9	6	4	5

Tabla 2. Resultados de la prueba de potencia realizada en cobayos sensibilizados con *M. phlei* (lote B).

Cobayo N°	Diluciones					
	PPD M. bovis			PPD M. phlei		
	1/100	1/500	1/2500	1/100	1/500	1/2500
1	12	11	11	9	6	5
2	13	14	15	6	5	6
3	13	14	14	10	8	6
4	18	16	13	10	8	9
5	16	11	12	9	8	7
6	12	13	16	10	6	10

Tabla 3. Resultados de la prueba de potencia realizada en cobayos sensibilizados con *M. porcinum* (lote C).

Cobayo N°	Diluciones					
	PPD M. bovis			PPD M. porcinum		
	1/100	1/500	1/2500	1/100	1/500	1/2500
1	14	10	6	12	8	4
2	13	12	10	9	4	4
3	17	12	8	12	9	8
4	12	11	4	6	4	6
5	17	13	10	11	10	5
6	12	9	6	6	4	6

Discusión y conclusión

En las tuberculinas heterólogas es esperable que el porcentaje de AB no supere el 10%[4]. Los resultados obtenidos permiten inferir que, si bien los cobayos se sensibilizaron con las MA, la antigenicidad presentada por las mismas no fue suficiente para ocasionar reacciones cruzadas a la PPDb. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores[5] en un estudio realizado en cobayos sensibilizados con *M. fortuitum* y *M. phlei* aisladas de suelo. El presente constituye el primer trabajo en Argentina en el que se realizó la prueba de potencia en cobayos sensibilizados con MA aisladas de muestras bovinas y utilizando una cepa de *M. porcinum* aislada de leche de tanque de tambo.

Bibiografia

-Traversa MJ. y col. 2011. Analecta Vet. 31 (1): 10-14.
-Cirone K. y col. 2012. XIX Reunión Científico Técnica de la AAVLD. Buenos Aires, Argentina.
-Senasa,2007.Online:http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/BOVINOS_BUBALINOS/PROD_PRIMARIA/SANIDAD/ENF_Y_ESTRAT/TUBERCULOSIS/file1011-tuberbov.pdf:6/8/2018).
-OIE, 2014. Manual Terrestre de la OIE. Capítulo 2.3.6. p8.
-Bernardelli, A y col. 2012. Ciencia Veterinaria. Vol. 14 (1).

I11- PRUEBAS CON SENSITINAS ELABORADAS A PARTIR DE MICOBACTERIAS AMBIENTALES AISLADAS DE BOVINOS APLICADAS EN UN RODEO POSITIVO A TUBERCULOSIS

F. Bresky[1]; M.A.Fiorentino[2]; C. Morsella[2]; L. Méndez[2]; B. Vasini Rosell[3]; ME. Eirin[3]; B. Alonso[4]; I. Rodrigo[4]; M.Sánchez[4]; M. Zumárraga[5]; F.A.Paolicchi[2]
[1]CIC-UNMdP Mar del Plata, Bs. As., Argentina. [2]Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA EEA Balcarce, Bs. As., Argentina. [3]CONICET, Bs. As., Argentina. [4]SENASA, Martínez, Bs. As., Argentina. [5]Instituto de Biotecnología, INTA Castelar.
bresky.florencia@inta.gob.ar

Introducción

La prueba de diagnóstico oficial de la tuberculosis bovina (TBB) es la prueba de intradermorreacción con tuberculina. Sin embargo, es factible encontrar animales reactores a la tuberculina bovina en rodeos considerados libres, caracterizados como falsos positivos. Se presume la presencia de estas reacciones interespecíficas es producto de sensibilizaciones cruzadas con otras micobacterias diferentes a aquellas del Complejo Tuberculosis, como las micobacterias ambientales (MA) o no tuberculosas (MNT) presentes en el medio ambiente. Estas MA podrían provocar una respuesta inmune capaz de interferir en el diagnóstico de TBB por las pruebas habituales.

El objetivo del trabajo consistió en evaluar la posible reacción cruzada con las MA, mediante el uso de tuberculinas elaboradas con MA aisladas de muestras bovinas y aplicadas en un rodeo positivo a tuberculosis por diversas pruebas diagnósticas.

Materiales y métodos

Se utilizaron 25 vacas Holando Argentino provenientes de un rodeo positivo a TBB por la prueba de tuberculina anocaudal. Las mismas fueron sometidas a la prueba intradérmica de tuberculina cervical comparativa (PITCC), en las cuales se inocularon los derivados proteicos purificados (PPD) elaborados en el DILAB SENASA con las MA: *M. phlei, M. fortuitum, M. porcinum* y de manera simultánea la PPD bovina (PPDb) (cepa AN5 de *M. bovis-SENASA*), PPD aviar (PPDa) (Cepa D4 de *M. avium-SENASA*) y PBS como control. Las cepas de MA, *M. phlei* y *M. fortuitum* fueron aislados a partir de carcasas bovinas con lesiones detectadas en frigorífico[2], mientras que *M. porcinum* a partir de muestra de leche de tanque de enfriado[3]. El volumen inoculado en cada uno de los animales fue de 0,1 mL. A las 72 h posteriores se efectuó la lectura evaluando el engrosamiento de la piel en el sitio de inoculación, clasificándolos en tres categorías[1]: positivo cuando la diferencia de lectura es ≥ 5 mm, sospechosos cuando oscila entre 3 y 5 mm y negativo cuando es ≤3 mm. Se extrajo sangre con y sin heparina de todos los animales para análisis de producción de gamma interferón (IFN-ɣ) y por ELISA, respectivamente, utilizando como antígenos la PPDb y las PPD MA. Para el ensayo de IFN-ɣ se utilizó un kit comercial (IDVet, Francia) y la prueba se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizaron tres necropsias de animales seleccionados al azar, se recolectaron muestras de tejidos estériles para cultivo bacteriológico y muestras de órganos en formol para análisis histopatológico. Los ensayos con animales fueron aprobados por la CICUAE (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación –INTA/CeRBAS) mediante resolución 072/2016.

Resultados

De los 25 animales analizados en la PITCC: 23 animales fueron positivos a la PPDb, 1 fue sospechoso y 1 negativo. El 56,5% de los reaccionantes positivos a PPDb reaccionaron de manera simultánea a 1 o más tuberculinas ambientales. En los plasmas estimulados con PPDb en el ensayo de IFN-ɣ se obtuvieron 10 animales negativos y 15 positivos. De éstos últimos, el 66,6% tuvo niveles significativamente elevados de densidad óptica a una o más PPD MA durante la lectura de absorbancia en la fase final del procedimiento. En la prueba de ELISA de *M. bovis* 14 animales fueron positivos, 2 sospechosos y 9 negativos; 85% de los animales positivos en esta prueba también lo fueron para las MA. En las 3 necropsias realizadas en animales seleccionados se observaron lesiones compatibles con TBB tanto macroscópicas como microscópicas, diagnóstico que fue confirmado por el cultivo bacteriológico, en donde se aisló *M. bovis* en la totalidad de las muestras.

Discusión y conclusión

Nuestros resultados permiten inferir que animales sensibilizados con *M. bovis* presentan un nivel de antigenicidad suficiente para ocasionar reacciones cruzadas a las PPD MA en las pruebas usualmente utilizadas para el diagnóstico de la TBB. Estos difieren de los obtenidos por Oriani[4], en un estudio realizado en bovinos con antecedentes de TBB, los cuales fueron tuberculinizados con PPDb, PPDa y PPD elaboradas a partir de cepas de MA aisladas de suelo, en el cual no se observó reacción cruzada. Sin embargo, la reacción interespecífica entre las micobacterias pudo ser observada por otros autores[5], en animales sensibilizados naturalmente con MNT del ambiente que reaccionaron de manera positiva a la PPDb en la prueba de tuberculina, dando animales falsos positivos. Existe cierta controversia respecto a la importancia de las MA en el diagnóstico de la TBB y son escasos los trabajos realizados en bovinos relacionados con esta temática en Argentina. Este es el primer trabajo realizado en nuestro país con tuberculinas elaboradas a partir de MA aisladas de bovinos en las pruebas utilizadas habitualmente para el diagnóstico de la enfermedad.

Bibliografía

1-Jorge C. y col. 2005. “Manual de diagnóstico de Micobacterias de importancia en Medicina Veterinaria.” AAVLD. Primera edición.
2-Traversa MJ. y col. 2011. Report of mycobacteria isolated from domestic and wildlife species during 2004-2008. Analecta Vet. 31 (1): 10-14.
3-Cirone K. y col. 2012. Aislamiento de *Mycobacterium porcinum* a partir de muestras de leche bovina de tanque de enfriado. XIX Reunión Científico Técnica de la AAVLD. Buenos Aires, Argentina.
4-Oriani, DS y col. 2011. Asociación entre el diagnóstico de Tuberculosis Bovina por intradermorreacción, la anatomopatología, la bacteriología y la posible interferencia con micobacterias ambientales. Ciencia Veterinaria.13.
5-Perusia y col. 2010. Bovine Tuberculosis false positive intradermal test with bovine PPD by the ingestion of Non Tuberculous Mycobacteria. Proceedings XXVI Congress of the World Association for Buiatrics. Santiago de Chile, Chile.

I12- COMPARACIÓN DE DIFERENTES PRUEBAS SEROLÓGICAS UTILIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS BOVINA, EN ARGENTINA

M.C. Moran [1,7]; A.R. Bence [1,3,5]; S.E. Gutiérrez [2,5]; M.G. de Yaniz [3]; A.L. Pérez [4]; L. Moriones [4]; M.B. Molina González [4]; S.M. Estein [1,5]

[1]Laboratorio de Inmunología. [2]Laboratorio de Virología. [3]Depto. de Fisiopatología. [4]Alumnos de la carrera de Medicina Veterinaria. CIVETAN; Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Pcia. de Buenos Aires. Pinto 399. Tandil (7000). [6]CONICET-[5]CIC. [7]ANPCyT

mcmoran@vet.unicen.edu.ar

Introducción

La Brucelosis Bovina es una enfermedad infecto-contagiosa, cuyo principal agente causal es *Brucella abortus* (*B. abortus*). Provoca significativas pérdidas económicas en la producción pecuaria debido a los problemas reproductivos que ocasiona. Es de distribución mundial y afecta al hombre considerándose una importante enfermedad zoonótica. En Argentina, el control y la erradicación de la brucelosis bovina se basa en la detección de los animales infectados a través de la serología y/o bacteriología, eliminación de los reaccionantes y vacunación de los animales indemnes. Las pruebas diagnósticas serológicas utilizadas en los bovinos, aprobadas por SENASA, son la aglutinación con antígeno tamponado en placa (BPA) o con Rosa de Bengala (RB) y enzimoinmunoanálisis indirecto (ELISA indirecto), como pruebas tamiz. Como pruebas complementarias/ confirmatorias, la seroaglutinación lenta en tubo (SAT), 2-mercaptoetanol (2ME), la polarización de la fluorescencia (FPA) y ELISA competitivo, y como prueba definitoria, la fijación del complemento (FC). Las pruebas convencionales BPA, RB, SAT, 2ME y FC utilizan antígenos (Ag) celulares constituidos por suspensiones de *B. abortus* en fase lisa inactivadas. En cambio, las pruebas inmunoenzimáticas y FPA emplean como Ag el LPS y el polisacárido de cadena O (PSO) de *B. abortus*, respectivamente, y poseen mayor sensibilidad y especificidad en relación a las pruebas convencionales [(1)].

El objetivo del presente trabajo fue comparar los resultados obtenidos mediante el empleo de las diferentes pruebas serológicas en el diagnóstico de la Brucelosis Bovina.

Materiales y métodos

Se tomaron muestras de sangre entera mediante punción de vena o arteria coccígea, de tres rodeos bovinos de la raza Aberdeen Angus (AA) pertenecientes a un mismo establecimiento, ubicado en el Partido de Ayacucho, provincia de Buenos Aires.

Se tomaron muestras de 895 vacas, pertenecientes a los rodeos AA negro, AA colorado y AA CUT. Se separó el suero, se agregó azida sódica (0,2% concentración final) y se conservó a 4°C.Todas las muestras fueron analizadas por BPA, RB y FPA en microplaca (FPAm) [(2)]. Las muestras con resultado positivo a las pruebas tamiz fueron analizadas posteriormente por SAT - 2ME. Para el desarrollo de estas pruebas se utilizaron los antígenos comerciales del laboratorio BIOTANDIL® (Laboratorio Biológico de Tandil, Argentina).

Los resultados fueron analizados mediante el Test "t" de Student para datos apareados (test de Mc Nemar), utilizando el programa GraphPad.

Resultados

La Tabla 1 muestra los resultados de las pruebas tamiz.

Tabla 1. Resultados en las pruebas BPA y RB

BPA	RB	n
+	+	11
+	-	39
-	-	845

BPA detectó significativamente más animales positivos comparada a RB ($p < 0.0001$).

Cinco de los 39 animales BPA positivos no detectados por RB resultaron positivos a las pruebas confirmatorias.

Del total de las muestras analizadas, 21 resultaron positivas a las pruebas serológicas confirmatorias. Los resultados se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados en las pruebas BPA, SAT – 2ME y FPAm

BPA	SAT- 2-ME	FPAm	n
+	+	+	13
+	+	-	3
+	-	-	34
-	-	+	5
-	-	-	840
50	16	18	895

Las diferencias obtenidas al comparar la detección por BPA y SAT – 2-ME versus FPA como prueba única no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$).

Discusión y conclusión

La prueba de BPA fue significativamente más sensible como prueba tamiz comparada a RB. Si bien la prueba RB demostró alta especificidad, su uso como prueba tamiz, como ocurre en otros países de Latinoamérica [(3, 4)], dejaría animales infectados en el rodeo que perpetuarían la infección.

Sin embargo, cinco animales positivos a FPA (0,56% de 895 animales) no fueron captados por las pruebas tamiz. Estos animales que escapan a las diferentes pruebas podrían considerarse potenciales fuentes de infección.

Las diferencias observadas pueden deberse a mayor sensibilidad de la prueba de FPA, capaz de detectar anticuerpos en estadios iniciales de infección, la presencia de anticuerpos incompletos específicos de Ag incapaces de dar reacciones de aglutinación [(4)], o bien a distinta eficacia para detectar distintos isotipos de anticuerpos en las técnicas empleadas.

Ninguna técnica diagnóstica es capaz de detectar el 100% de los animales infectados. Debido a esto, se debería maximizar el uso de técnicas altamente sensibles y específicas disponibles en el país, de simple labor, para garantizar al máximo el control de la Brucelosis Bovina.

Bibliografía

1-Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. 2009. SENASA. Pág. 14-22.

2- Gutiérrez, S. E., Lützelschwab, C. M., Diaz, A. G., Estein, S. M. (2014) Fluorescence Polarization Assay for the diagnosis of anti-Brucella abortus antibodies in cattle serum: adaptation for ita use in microplates and comparison with conventional agglutination tests. J Vet Sci Med Diagn. 3:3.

3-.Marlño-Jannaut, O. C. (2000) Brucelosis: metodologías diagnósticas e interpretación de resultados. MVZ-CORDOBA 5(1): 57-60.

4- Dájer-Abimerhi, A., Gutiérrez-Ruiz, E. J., Zapata-Villalobos, D., Honhold, N., Villegas-Pérez, S. L. (1995) Comparación de cinco pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra Brucellaabortus y reporte preliminar del porcentaje de reactores positivos en hatos bovinos en Yucatán, México. RevBiomed. 6:84-90.5- (3): S50-S52.

5-Aguilar García, (2004) Reacciones de aglutinación. GacMéd Méx. 140

I13- EVALUACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES EN LA PRUEBA DE INTERFERÓN GAMMA EN BOVINOS TUBERCULOSOS NO REACTORES A LA PRUEBA TUBERCULÍNICA

X. Ferrara Muñiz[1], S. G. Garbaccio[2], F. Delgado[2], C. Garro[2], P. Huertas[2], M. J. Marfil[1], M. J. Zumárraga[1], M. E. Eirin[1],
1-Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.
2-Instituto de Patobiología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.
eirin.maria@inta.gob.ar

Introducción

La tuberculosis se encuentra presente en rodeos bovinos de nuestro país, impactando a nivel de los sistemas de producción de cría y lecheros por disminuir la eficiencia productiva de los animales infectados e imponer restricciones al comercio internacional de productos cárnicos, lecheros y sus derivados. A su vez, constituye un problema de salud pública por tratarse de una zoonosis. A nivel internacional, se ha demostrado que la prueba intradérmica de la tuberculina es eficaz en la identificación de los animales infectados por *M. bovis*, el agente causal de la tuberculosis bovina (TBB), siendo la prueba oficial a nivel local que se emplea en el marco del plan de control y erradicación (SENASA, Resol. 128/12)[1]. Sin embargo, existen animales que por diferentes causas si bien están infectados no reaccionan a dicha prueba, representando un problema para aquellos establecimientos que entran en etapa de saneamiento. Estos animales constituyen potenciales focos de infección ya que pueden ser excretores de la micobacteria. La determinación de liberación de interferón gamma (IFN-ɣ) es una técnica que puede emplearse de manera complementaria a la prueba intradérmica de la tuberculina. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la determinación de IFN-ɣ, utilizando como inmunógeno proteínas recombinantes de *M. bovis* con el fin de estudiar la capacidad de detección de animales no reactores a la prueba tuberculinica en rodeos en saneamiento.

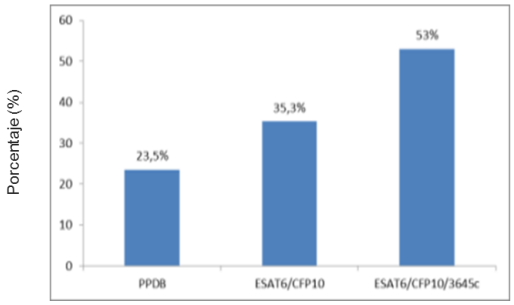
Materiales y métodos

Se estudiaron un total de 17 bovinos de la raza Holando Argentino, provenientes de diferentes explotaciones lecheras. Los animales tenían historia previa de resultado negativo a la prueba tuberculinica y provenían de rodeos en saneamiento. Sin embargo, habían resultado positivos al serodiagnóstico. La necropsia de los mismos evidenció la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis, con cultivo positivo para *M. bovis*[2]. A partir de una muestra de sangre anticoagulada con heparina, se realizó la estimulación con diferentes antígenos: tuberculina aviar, tuberculina bovina (Thermo Fisher Ltd, Switzerland), una mezcla antigénica de las proteínas recombinantes ESAT6/CFP10 y ESAT6/CFP10/Mb3645c. Como controles se utilizó buffer fosfato salino (PBS) y un mitógeno celular (*Pokewed mitogen*). Para la detección de IFN-ɣ se empleó un kit comercial (Bovigam, Thermo Fisher Ltd, Switzerland). La liberación de IFN-ɣ se determinó por espectrofotometría siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados de los antígenos recombinantes se realizaron teniendo en cuenta la densidad óptica (DO) de un determinado antígeno menos la obtenida en presencia de PBS (basal) (ΔDO). Un valor de ΔDO≥0.1 fue considerado positivo. Los resultados se analizaron con el programa *GraphPad Prism* versión 5.01.

Resultados

Del total de animales estudiados, 23,5% (4/17) fueron positivos según los criterios de positividad del kit comercial. A su vez, se detectaron 35,3% (6/17) de animales positivos cuando se estimuló la sangre con la mezcla antigénica ESAT6/CFP10; 3 de ellos habían sido negativos según el criterio de positividad del kit comercial. Cuando se empleó la mezcla antigénica ESAT6/CFP10/Mb3645c 53% (9/17) de los animales resultaron positivos, 5 de ellos habían sido negativos según el criterio de positividad del kit comercial (Figura 1). De los 9 animales positivos para ESAT6/CFP10/Mb3645c, 2 bovinos reaccionaron positivamente sólo cuando se estimuló la sangre con ESAT6/CFP10/Mb3645c, mientras que los 7 restantes reaccionaron también ante la estimulación con tuberculina bovina y/o con ESAT6/CFP10. Ambas mezclas recombinantes ESAT6/CFP10 y ESAT6/CFP10/Mb3645c detectaron a los 4 bovinos que habían sido diagnosticados como positivos según la estimulación con tuberculina empleada en el kit comercial.

Fig1. Frecuencias de animales positivos para la técnica *in vitro* de liberación de IFN-ɣ según se estimularon con los diferentes antígenos (tuberculina o con diferentes mezclas de los antígenos).



Discusión y conclusión

El empleo de los antígenos permitió elevar en un 50% la detección asociada a la tuberculina, indicando que los mismos podrían representar una herramienta valiosa en la optimización del diagnóstico *in vitro* para la TBB en animales no rectores a la prueba tuberculinica.

Se confirmó la utilidad del empleo de antígenos recombinantes como ESAT6, CFP10 y Mb3645c conocidos como potentes inductores de la respuesta inmune mediada por células.

Los resultados sugieren que la mezcla ESAT6/CFP10/Mb3645c sería la indicada ya que complementaría a la tuberculina en la técnica de detección *in vitro* de liberación de IFN-ɣ, permitiendo detectar la una mayor cantidad de animales infectados.

Bibliografía

1- www.senasa.gov.ar
2-Tesis Doctoral. Dr. Garbaccio. Mejoramiento del diagnóstico de la tuberculosis bovina a partir de diversas muestras clínicas. Fac. Cs. Veterinarias, UBA.

I14- EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE ROSA DE BENGALA MODIFICADA EN EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS PORCINA

A.R. Bence[1,5], *S.E. Gutiérrez*[2,5], *M.A. Rivero*[3,5], *C.S. Cacciato*[4,5], *S. M. Estein*[1,5]

[1] Laboratorio de Inmunología [2] Laboratorio de Virología, [3]Área de Epidemiologia Básica. [4]Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental. [5]CIVETAN – CONICET - CIC. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Pcia. de Buenos Aires. Pinto 399. Tandil (7000).

arbence@vet.unicen.edu.ar

Introducción

La brucelosis porcina es una enfermedad infecto-contagiosa, zoonótica y de curso crónico ocasionada por *Brucella suis.* Se caracteriza por provocar aborto, infertilidad y patologías osteoarticulares, además de innumerables pérdidas económicas en la industria porcina. El diagnóstico serológico se realiza mediante la misma metodología implementada en bovinos, se realiza una prueba tamiz (Antígeno Bufferado en Placa (BPA) o Rosa de Bengala (RB)), siendo los positivos analizados mediante la prueba confirmatoria de Polarización de la Fluorescencia (FPA). El diagnóstico generalmente se establece a nivel de la piara, ya que estas pruebas son sensibles y aplicables a un gran número de muestras, poseen baja especificidad, pero no están debidamente estandarizadas para la especie porcina.

El objetivo de este trabajo fue evaluar modificaciones en las relaciones de antígeno RB y suero porcino, así como en los tiempos de lectura, respecto de la técnica oficial.

Materiales y métodos

Se analizaron 173 muestras de porcinos de diferentes categorías. Se obtuvo sangre mediante punción yugular y se obtuvo el suero. La detección de anticuerpos específicos se realizó mediante las pruebas de BPA, RB convencional (RB_C), RB modificada (RB_M) y FPA. Se emplearon dos sueros controles positivos y dos sueros controles negativos en cada prueba.

En todos los casos se utilizaron antígenos cedidos por BIOTANDIL (Laboratorio Biológico de Tandil SRL). Las determinaciones de FPA se realizaron con un polarímetro Sentry 100. Las pruebas RB_C, BPA y FPA se realizaron e interpretaron de acuerdo a la normativa oficial (Nicola, 2009). La prueba RB_M se realizó empleando 75 µl de suero y 25 µl de antígeno con lectura a los 4, 6 y 8 minutos.

Se estimó la Sensibilidad (S), Especificidad (E) y Valores Predictivos (VP) de RB_C y RB_M, considerando como verdaderos positivos aquellos sueros que expresaban valores positivos a BPA y FPA en conjunto, así como verdaderos negativos a los que fueron negativos a ambas pruebas.

Para determinar la concordancia entre las pruebas se evaluó el índice Kappa con un 95% de confianza (IC95%) y se calificó del siguiente modo:

- excelente: índice Kappa mayor que 0,75.
- buena: índiceKappa entre 0,40 y 0,75.
- pobre: índice Kappa menor que 0,40.

Resultados

Dado que la lectura con la técnica de RB_M resultó ser más efectiva a los 8 minutos, para el análisis se utilizaron los resultados obtenidos con ese tiempo de lectura. El porcentaje (proporción) de sueros positivos detectados por cada una de las pruebas serológicas fue: 17,91% (31/173) para RB_C; 38,73% (67/173) para RB_M; 42,77% (74/173) para BPA y 60,69% (105/173) para FPA.

La aglutinación siempre se hizo más visible a medida que el tiempo de lectura transcurría. Los controles nunca se modificaron con el correr del tiempo.

La concordancia general entre las pruebas serológicas analizadas fue excelente para RB_M-BPA y RB_M-BPA+FPA; buena para RB_M-FPA y pobre para RB_C-BPA, RB_C-FPA y RB_C-BPA+FPA (Tabla 1).

Tabla 1. Concordancia general entre las pruebas serológicas

Pruebas serológicas		Kappa (IC95%)
RB_C	**BPA**	0,37 (0,25-0,5)
RB_M	**BPA**	0,82 (0,7-0,9)
RB_C	**FPA**	0,2 (0,1 – 0,3)
RB_M	**FPA**	0,56 (0,42-0,69)
RB_C	**BPA+FPA**	0,36 (0,22 – 0,5)
RB_M	**BPA+FPA**	0,88 (0,71 – 1)

***BPA+FPA:** resultados coincidentes a ambas pruebas

En la **Tabla 2** se expresan los valores de S, E, VP positivo, VP negativo y exactitud para las pruebas RB_C y RB_M. La modificación en la técnica de RB (RB_M) mejoró sensiblemente la especificidad y notablemente la sensibilidad respecto de RB_C.

Tabla 2. Evaluación global de las pruebas diagnósticas RB_C y RB_M

	RB_C	**RB_M**
S	40,0% (28,5-51,5)	88,6% (81,1 – 96)
E	96,9% (92,6 – 100)	100% (100 – 100)
VP positivo	93,3% (84,4 – 100)	100% (100 – 100)
VP negativo	59,6% (50,2 – 69)	88,9% (81,6 – 96,1)
Exactitud	67,2% (59,2 – 75,1)	94,0% (90 – 98)

Discusión y conclusión

Las modificaciones realizadas en la prueba de RB_C, mejoraron notablemente los resultados obtenidos para el diagnóstico de la brucelosis porcina.

La mayor cantidad de animales detectados por FPA fue debida posiblemente a una mayor sensibilidad analítica de esta prueba, que permite identificar animales en el inicio de la infección, cuando los títulos de anticuerpos son aún bajos.

SENASA y la OIE recomiendan el RB como prueba tamiz, en su versión estandarizada para bovinos (RBc); sin embargo esta técnica presentó muy baja sensibilidad diagnóstica respecto a las otras pruebas analizadas. Nuestros resultados coinciden con lo observado en la especie caprina y ovina, en la que el aumento en la relación suero/antígeno, mejora notablemente la sensibilidad de la prueba de RB.

Estos resultados indican que, tal lo observado para la brucelosis caprina, las recomendaciones oficiales en relación a la prueba de RB no serían adecuadas para el diagnóstico de la brucelosis porcina.

Los autores agradecen al Laboratorio Biotandil S.R.L. los antígenos cedidos y el análisis de las muestras mediante la prueba de FPA.

Bibliografia

-Alton *et al*., 1988.Techniques for the brucellosis laboratory.

-Blasco *et al.*, 1994. Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Veterinary Record*, *134*(16), 415-420.

-Díaz Aparicio *et al*., 1994. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *Journal of Clinical Microbiology*, *32*(5), 1159-1165.

-Nicola y Elena, 2009. Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. SENASA. Argentina.

-Robles, C.A. 2009. Manual de brucelosis caprina. INTA.

ENFERMEDADES METABÓLICAS Y CARENCIALES

M1- CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA PARA CONSUMO HUMANO, DPTO. DE POCHO, PROVINCIA DE CÓRDOBA

A. NILL[2]; A. Sandoval[1]; M. Ponce[1], M. Ortiz[1]; V. Freire[1]; D. Agüero[1], J. Salminis[1], P. Melegatti[1]; M. Lasagno[2].
Fac Agronomía y Veterinaria[1]. Fac. Cs. Exactas Fco Qcas y Naturales[2]. UNRC. anapaulanill@gmail.com

Introducción

Los pequeños productores de las serranías centrales de Pocho, noroeste de Córdoba, se dedican a la cría de ganado caprino y a la quesería. Estos sistemas productivos se caracterizan por condiciones de vida precarias y ausencia de infraestructura de redes hídricas. En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo se observó que las familias mayormente se abastecen de agua de aljibe (54 %). Ademas se registró ausencia de prácticas de potabilización del agua destinada al consumo familiar y manufactura de productos en el 75% de las familias encuestadas (Freire *et al.,* 2013). Cabe mencionar que en épocas de sequía el agua para consumo humano se provee a través de un camión cisterna.

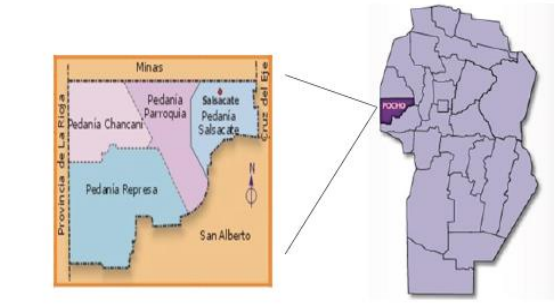
El agua para consumo humano es apta bacteriológicamente si se encuentra exenta de microorganismos patógenos. La presencia de estos microorganismos es un riesgo que se incrementa en zonas sin disponibilidad de agua potable. Hay más de 500 patógenos (reconocidos y potenciales) transmitidos por el agua, tales como virus, bacterias, protozoos y hongos (Ashbolt, 2015). El agua ha sido repetidamente vinculada a brotes o casos aislados de enfermedad producida por *E. coli* O157:H7 y a otros serotipos (Tanushree *et al*., 2015).

Por lo antes expuesto el objetivo de este trabajo, es evaluar la calidad del agua para consumo humano a través del estudio de marcadores de contaminación.

Materiales y métodos

Se analizaron los parámetros bacteriológicos requeridos por el Código Alimentario Argentino (CAA), siguiendo la metodología establecida por Standard Methods (APHA 1998), en el laboratorio de Genética Bacteriana, Dto de Microbiología e Inmunología. Se realizaron las siguientes determinaciones: número de bacterias mesófilas viables (FI 100b: 1991); investigación y recuento de bacterias coliformes totales (ICMSF, Microorganisms in Foods 1 Método 2, 1978); determinación de la presencia de *E. coli* (ICMF, Microorganisms in Foods 1. 1983) y determinación de la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* (APHA 1998).

Las muestras de agua analizadas fueron aisladas en la pedanía Chancaní, Dpto. de Pocho, Provincia de Córdoba, hacia el oeste provincial; la región corresponde al monte árido, donde las características del suelo y las altas temperaturas, provocan un gran déficit hídrico anual. Se recolectaron 16 muestras de agua, 8 muestras de aljibe y 8 de pozo a balde, procedentes de los Parajes La Patria, Los Medanitos, El Quemado, Los Quebrachitos, Los Médanos y Chancaní, durante un período de 23 meses.



Pedanía Chancaní, Departamento Pocho, Provincia de Córdoba

Provincia de Córdoba

Resultados y discusión

El 75% (12/16) de las muestras analizadas no reúne los parámetros exigidos por el CAA para agua potable. El 25%, que si cumple la normativa pertenece a muestras recolectadas de aljibe. En una muestra de agua se aisló *E coli* y en otra: *Pseudomonas*, en ambos casos las muestras proceden de agua de pozo de Chancaní. Resultados semejantes fueron informados por Gamazo y col (2018) quienes analizaron muestras de agua subterránea usada para consumo humano, en zona rural de Uruguay. Sus resultados arrojaron que el 72,6% muestras fueron positivas para los indicadores bacterianos.

El lÍmite de tolerancia para mesófilos totales es de 500 UFC/ml, y en este estudio el valor promedio para este grupo fue de $7{,}06 \times 10^4$ UFC /ml, por lo que un 62,5 % (10/16) de las muestras de agua estudiadas excedieron este valor. Recuentos semejantes fueron informados por Alves y col (2014) a partir del estudio de muestras de agua procedentes de 7 cisternas del área semiárida de Brasil, detectando que el 46,6% exceden el umbral establecido. Con respecto a las coliformes totales el 56% (9/16) de las muestras exceden el umbral permitido para este grupo microbiano, no obstante en sólo una de ellas se aisló *E coli.* Se ha señalado que la presencia de coliformes fecales en agua está indicando contaminación reciente por efluentes residuales o estiércol animal. Una importante fuente de contaminación son los sitios donde se acumula estiércol, como por ejemplo corrales y lagunas cercanas a las perforaciones.

Conclusiones

Este estudio contribuye al conocimiento sobre la calidad del agua usada en Chancaní en términos microbiológicos y su aptitud para el consumo humano. Por lo tanto es recomendable que el agua se desinfecte adecuadamente antes de ser utilizada para beber y otras aplicaciones domésticas. Es necesario concientizar a los productores de la región sobre la importancia de establecer acciones correctivas para mejorar la calidad del agua, contribuyendo así al mejoramiento de la calidad de vida de la población.

Bibliografía

-Alves, F.; Thorsten Köchling, J Luz, and S Gavazza. 2014. Water quality and microbial diversity in cisterns from semiarid areas in Brazil. J. of Water and Health, 12.3 pp:513-525

-Ashbolt N J. 2015. Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. Curr Envir Health Rpt 2:95–106

-Freire V; D. Agüero; M. Ponce Crivellaro; M. Lasagno; G. Sandoval; N. Marcucci; C. Gramaglia; R. Carrera y J. C. Sánchez. 2013. Capacidad de inserción de productores de quesos artesanales caprinos del NO de Córdoba en la comercialización formal. XLIV Reunión Anual AAEA.

-Gamazo, P., M. Victoria, J Schijven, E. Alvareda, L. Tort, J Ramos, L. Burutaran, Castells, R Colina. 2018. Evaluation of Bacterial Contamination as an Indicator of Viral Contamination in a Sedimentary Aquifer in Uruguay. Food and Environmental Virology. https://doi.org/10.1007/s12560-018-9341-9.-

-Tanushree S, P Kaushik, M Krishna Mohan. 2015. Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. Review. Diagnostic Microbiol and Infectious Disease 82: 249–264

M2 - RELEVAMIENTO DEL PERFIL MINERAL DEL GANADO CAPRINO EN 5 PROVINCIAS ARGENTINAS

C.E. Rossanigo[1]; W. Page.[1], D.O. Bedotti [2], V.H. Suarez [3], J.A. Manazza [4]
1- EEA INTA San Luis. (V. Mercedes). 2- EEA INTA Anguil. 3- EEA INTA Salta 4- EEA INTA Balcarce.
E-mail: rossanigo,carlos@inta.gob.ar

Introducción

El ganado caprino sufre regularmente de enfermedades que se producen por carencias de minerales. Las enfermedades carenciales por minerales no se presentan generalmente como procesos únicos, sino que actúan por mecanismos diversos por lo que los síntomas que se pueden observar pueden llegar a ser confusos al momento de diagnosticar y pueden desorientar a quienes los diagnostican. En otros casos, las enfermedades carenciales evolucionan sin síntomas apreciables que reclamen intervención clínica y se manifiestan por medio de la disminución de rendimiento, falta de desarrollo o producción que son difíciles de valorar a menos que se lleven controles regulares. Estas carencias sin manifestación clínica aparente, forman parte de las llamadas enfermedades subclínicas, que son de suma importancia, ya que producen pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas al cabo de un ciclo de crianza. Las principales enfermedades por carencia de minerales en los caprinos son la hipocalcemia, las descalcificaciones óseas y fracturas, la tetania hipomagnesémica, la ataxia enzóotica, la queratoconjuntivitis, la pododermatitis plantar (pietín), el retardo de crecimiento, las disfunciones y fallas reproductivas y la baja de inmunidad. Algunas veces, como sucede con el calcio, ciertas plantas tóxicas aumentan la absorción intestinal de este mineral produciendo una calcinosis con anormalidades de los huesos y calcificaciones en pulmones, articulaciones y en grandes vasos. El presente trabajo tiene como objetivo comunicar los resultados serológicos de Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Cobre (Cu) y Zinc (Zn) del ganado caprino obtenido en cinco provincias caprineras de nuestro país,

Materiales y métodos

Las muestras sanguíneas de 5606 cabras y machos adultos fueron extraídas entre los años 1991 y 2016 en 279 majadas de los sistemas reales caprineros de cinco provincias de Argentina: La Pampa 2322 animales de 143 majadas (a/m) de 7 departamentos del oeste pampeano (Chical-Có 808/51, Chalileo 310/22, Puelén 717/39, Limay Mahuida 170/9, Curacó 287/20, y Lovontué 30/2), San Luis 1120 animales de 41 majadas de 4 departamentos (Pedernera 427/12, Ayacucho 273/11, Belgrano 303/12 y Junín 117/6), Salta 685 animales de 34 majadas de 4 departamentos (Guachipas 181/10, Cerrillos 321/6, Rivadavia 60/6 y Rosario de Lerma 123/12), Jujuy 144 animales de 13 majadas de dos departamentos de la Quebrada de Humahuaca (Humahuaca 112/11 y Tilcara 32/2) y 1335 animales de 48 majadas de 2 departamentos del oeste de Córdoba (Cruz del Eje 731/28 y Pocho 604/20). Los valores individuales de calcio (Ca mg/%), magnesio (Mg mg/%), cobre (Cu ppm), y zinc (Zn ppm) se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer modelo 2380).

Resultados

Las muestras procesadas (n) y los resultados medios obtenidos por majada figuran en la siguiente tabla:

Tabla 1: Niveles minerales de ganado caprino adulto de las majadas de cada provincia (Muestras (n), valor promedio y desvió estándar (DE).

	Ca		Mg		Cu		Zn	
	n	Media DE (±)	n	Media DE (±)	Majadas	Media DE (±)	Majadas	Media DE (±)
La Pampa	1654	**8,94** ±1,67	1785	**1,85** ±0,39	2304	**0,62** ±0,10	2301	**0,51** ±0,09
San Luis	1109	**11,77** ±2,02	1109	**2,54** ±0,28	1120	**0,63** ±0,09	1120	**0,63** ±0,11
Córdoba	1087	**8,65** ±1,38	985	**2,81** ±0,51	1229	**0,56** ±0,14	1229	**0,74** ±0,25
Salta	671	**10,87** ±3,73	626	**2,73** ±0,42	680	**0,57** ±0,13	622	**0,58** ±0,12
Jujuy	141	**8,09** ±2,75	139	**2,36** ±0,46	144	**0,49** ±0,12	144	**0,72** ±0,17
Valores normales	8 a 11,5 mg/%		1,5 a 3 mg/%		0,7 a 1,3 ppm		0,5 a 2,5 ppm	

Discusión y conclusiones

El perfil mineral estudiado en el presente trabajo es parte de un relevamiento realizado en por diferentes grupos dedicados a la salud caprina de diferentes partes del país. Hay pocos registros previos de determinaciones de este tipo a nivel nacional que caracterizan los niveles séricos de los caprinos en los sistemas reales de producción. A excepción de los antecedentes de ataxia enzoótica por deficiencia de cobre, las majadas estudiadas no evidenciaron síntomas clínicos de carencia, pero seguramente se vieron afectadas con signos subclínicos con posibles pérdidas en ganancia de peso e índices reproductivos que suelen ser los más relevantes y generalmente no detectadas por el productor. Los bajos valores de Cu séricos en todas las provincias indican deficiencias de este metal que podría expresarse clínicamente como Ataxia enzóotica y como animales con retraso en el crecimiento. El resto de los minerales presentan valores normales y con niveles concordantes con la bibliografía. Teniendo en cuenta que el perfil mineral en los animales es el resultado de la relación suelo/planta/animal, bajo un cierto manejo del sistema de producción particular de cada región, estos observaciones a nivel de establecimiento son una buena herramienta para orientar y ajustar la suplementación mineral. Se espera que los resultados obtenidos puedan ser tomados como valores de referencia para detectar carencias minerales del ganado caprino adulto en las distintas regiones caprineras de nuestro país.

Bibliografía

Bedotti, D., Babinec, F., Sager, R. (1994). Dosaje de cobre sanguíneo en cabras y su relación con la presentación de ataxia enzóotica en cabritos en el oeste de la provincia de La Pampa. VII Reunión Nac.de Producción Caprina. Bariloche. Resumen CO14.

Bedotti, D. O., Sanchez Rodriguez, M. (2002). Observaciones sobre la problemática sanitaria del ganado caprino en el oeste pampeano. Vet. Argentina. Vol. XIX (182): 100-112.Sager R. L., Rossanigo C. E. (2002).Valores séricos de calcio, fósforo, magnesio, cobre y zinc en cabras del centro-oeste de la

Argentina. XIV Reunión Científico Técnica AAVLD. Villa Gral Memorias de resúmenes, Patología clínica PC-06.

Suárez, V.H., Dodero, A.M., Almudevar F.M., Bertoni, E.A., Salatin, A.O, Viñabal, A.E., Saldaño, R., Martínez, G.M., Micheloud, J.F., Fiorentino, MA., Brihuega, B., Romera S.A.

M3- PERFIL MINERAL EN EQUINOS DE RAZA PERUANO DE PASO EN EL VALLE DE LERMA (PCIA. DE SALTA). RESULTADOS PRELIMINARES

F. Saravia[1*]; V. Martínez [1]; L. Borrelli[1]; G. Trova[1]; M. Céspedes [1]; F. Dannunzio [1]; G. Vitulli [1]; L. Arjona[1]
[1]Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Católica de Salta,
Campo Castañares (Salta-Argentina), C.P. 4400.
fsaravia01@yahoo.com.ar

Introducción

La cría de caballos Peruanos de Paso se considera una afición muy arraigada en el sector rural salteño. Por otra parte, es ampliamente conocida la importancia de una correcta nutrición mineral de los animales para sobrellevar las exigencias naturales de las etapas en su ciclo productivo tales como crecimiento y desarrollo, reproducción, gestación y lactancia. Es por esto y ante las carencias de estudios similares en la zona y por ende de valores de referencia, que creemos será de un gran aporte contribuir al estudio de las deficiencias minerales de los equinos en la Provincia de Salta.

El objetivo del presente trabajo consistió en relevar los niveles de magnesio, calcio y fósforo, tanto en suero, como en pasto y agua, en establecimientos de cría equina de la raza Peruano de Paso, en el Valle de Lerma.

Materiales y métodos

Las muestras se tomaron en 5 establecimientos ubicados en diferentes localidades del Valle de Lerma, durante el otoño de 2017, en los cuales no se utilizaba suplementación mineral.

Se sangraron por venopunción yugular (sin anticoagulante) un total de 100 equinos (20 animales en cada establecimiento), agrupándolos según sexo, estado reproductivo y edad. Sobre el suero se determinó: magnesio (Mg), por método colorimétrico, técnica del azul de xylidyl blue en medio alcalino (Wiener lab) realizándose las lecturas de absorbancia a 510 nm; calcio sérico total (Ca), por método de la cresolftaleín complexona (cfx) a pH 11, dando un complejo de adición color magenta que se mide fotocolorimétricamente a 570 nm; y fósforo inorgánico (P), por método colorimétrico, técnica del molibdato en medio arsenito/citrato (Wiener lab) con lecturas de absorbancia entre 620 y 650 nm.

Se obtuvieron las muestras de agua directamente de donde abrevaban los animales, midiéndose Ca y Mg por el método titulométrico y P por espectrofotometría.

Las muestras de pasto fueron recolectadas del lote en el cual se encontraban pastoreando los equinos, tomando de 5 a 10 submuestras, recorriendo la totalidad del mismo. Se determinó Mg y Ca por extracción por vía húmeda y cuantificación volumétrica por E.D.T.A, y P por extracción por vía húmeda y espectrofotometría.

Resultados y discusión

En las tablas 1 y 2 se presentan los resultados de las determinaciones realizadas.

Tabla 1. Concentraciones de Mg, Ca y P en agua (mg/ l) y pasto (%), por establecimiento en otoño de 2017.

	Mg		Ca		P	
	Agua	Pasto	Agua	Pasto	Agua	Pasto
Referencia	*2-83*	*0,2*	*14-52*	*0,4*	-----	*0,24*
La Isla	7.6	0.3	32.2	1.4	2.8	0.9
El Mollar	6.8	0.2	29.6	1.3	2.6	1.1
La Falda	8.2	0.4	33.5	2.4	2.8	1.2
Cámara	8.5	0.3	38	0.9	3.6	1.3
Castellanos	3.6	0.3	18.8	0.8	0.8	0.7

Tabla 2. Media + desvío estándar de Mg, Ca y P en sangre (mg/dl), por establecimiento en otoño de 2017.

	Mg	Ca	P
Referencia	*2 -3*	*9 -10*	*3 -6*
La Isla	2.20 +0.30	8.91 +3.13	2.34 +1.21
El Mollar	2.01 +0.21	9.69 +2.88	2.14 +1.15
La Falda	2.29 +0.23	15.86+2.91	4.25 +1.24
Cámara	2.28 +0.28	7.58 +2.27	2.84 +1.20
Castellanos	1.80 +0.24	10.83+1.96	1.83 +0.79

En Mg, podemos observar que en cuanto al agua, en todos los establecimientos los valores fueron bajos, siendo particularmente muy bajos los de Castellanos, según valores de referencia de Salusso y Moraña (2002). Y en sangre, en comparación con la referencia (Coppo, 2008), Castellanos obtuvo una media por debajo de 2, con un 85 % de los animales con hipomagnesemia, lo cual se relaciona con su valor en agua, sugiriendo una deficiencia de tipo primaria. En El Mollar hubo 56 % de hipomagnesemia.

En Ca, solamente en Castellanos se encontraron niveles bajos en agua. Pero, en sangre, en La Isla y Cámara se determinaron medias por debajo de la referencia, con 74 y 79 % de equinos con hipocalcemia, respectivamente.

Y con respecto al P, en 4 de los 5 establecimientos hubo medias (en sangre) debajo de la referencia, con la mayoría de sus animales con hipofosfatemia.

En el pasto, no se encontraron niveles por debajo de los valores de referencia (Cseh, 2011) en ningún establecimiento.

Conclusiones

Con este trabajo, hemos realizado una contribución necesaria al conocimiento acerca del perfil mineral de los caballos Peruano de Paso en la región. Sin embargo, se deben repetir dichos muestreos en las otras estaciones del año para completar el estudio en cuestión.

Bibliografía

-Coppo, J.A. 2008. Fisiología comparada del medio interno. Ed. EUCASA. 309 p.

-Cseh, S.B.; Ramiro, F.A.; Fumagalli, A.E.; Ávila, A.M.; Reineri, P.S. 2011. Relevamiento de deficiencias minerales en cuatro sitios de Santiago del Estero. *Rev Arg Prod Anim* 31 (Supl. 1): p. 19.

-Salusso, M.M.; Moraña, L.B. 2002. Calidad del Agua de Uso Agropecuario en los Valles Intermontanos de Lerma, Metán y Calchaquíes (Salta). Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA 2002. 28 p.

M4- CORRELACIÓN ENTRE SELENIO EN SANGRE ENTERA Y COBRE EN SUERO DE BOVINOS

EC.Brambilla[1];EL. Fernández[1]; ML.Drake[1];AM. Rodríguez[2]; J. García Lorenzana[2]; J.Marinissen[3]; D.Antonelli[4]; AJ.Pantiu[5]; A.Adaro[6]
[1] EEA INTA Balcarce, [2]EEA INTA Cuenca del Salado, [3]EEA INTA Hilario Ascasubi, [4]Asociación de Productores de Villarino Sur. (APROVIS) [5]EEA INTA Montecarlo, [6]AER INTA Chepes.
brambilla.emilio@inta.gob.ar

Introducción

El selenio (Se) y el cobre (Cu) son dos elementos esenciales con una probada interacción metabólica en mamíferos. Ambos se encuentran implicados en el metabolismo antioxidante a través de la neutralización de los radicales libres nocivos, que son generados como productos secundarios del metabolismo energético. En rumiantes, la interacción entre Se y Cu ha sido establecida en gran número de trabajos. En estos se menciona que un bajo nivel de Se en sangre genera una menor absorción de Cu y viceversa (Van Ryssen, et al. 1998). En el laboratorio de Bioquímica Clínica Veterinaria (LBCV) del INTA Balcarce se realiza la determinación de Se en sangre entera y de Cu en suero para diagnosticar deficiencias, principalmente en bovinos. El objetivo de este trabajo fue encontrar una asociación entre los valores de Cu séricos y del Se en sangre

Materiales y métodos

Se trabajó con 611 datos de Se en sangre entera y su correspondiente Cu en suero. Dichos datos provienen de análisis realizados en el LBCV en 6 establecimientos ubicados en las provincias de Misiones, La Rioja, Santa Fe, Corrientes y Buenos Aires. Estos eran todos establecimientos de cría bovina sobre pastizal natural. El Se en sangre se cuantificó mediante la determinación por horno de grafitos acoplado a un espectrofotómetro de absorción atómica, mientras que el Cu en suero fue mesurado por un espectrofotómetro de absorción atómica. Luego, una vez cotejados con los valores de referencia en bovinos, se calculó el porcentaje de sangres deficientes en Se cuando los Cu en los respectivos sueros eran o no eran deficientes; y el porcentaje de sueros que eran deficientes en Cu cuando el Se de las respectivas sangres eran o no deficientes. La comparación de dichas proporciones se realizó a través del MedCalc 4.16b, considerando significativo un P valor <0,05 y tendencia un P valor <0,10

Resultados y discusión

Se observó una tendencia (p valor: 0.07) a que el porcentaje de animales deficientes en Se sea menor (7,3%) cuando la respectiva cupremia es adecuada (Tabla 1). Por otro lado, también se ve una tendencia (p valor: 0.08) a que el porcentaje deficientes en Cu sea menor (8,2%) cuando en sus respectivas sangres la concentración de Se es adecuada. Estos resultados están alineados a lo hallado en bibliografía y evidencian la tendencia existente a una interacción directa entre estos minerales. El sinergismo metabólico está principalmente fundado en que son minerales esenciales para la función de enzimas como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. Estas son enzimas claves en el metabolismo antioxidante y se encuentran encadenadas en lo que respecta a la neutralización de especies reactivas de oxígeno nocivas. Así, por ejemplo, en situaciones de deficiencia de Se Ataollahi, et al (2013) observaron una disminución del Cu sérico. Los autores indicaron que el descenso de la cupremia está vinculado a la utilizacion del mineral para reparar el músculo cardíaco.

Tabla 1: Porcentaje de deficiencias de Se cuándo el Cu es deficiente o adecuado en las respectivas sangres y porcentaje de deficiencias de Cu cuando el Se es deficiente o adecuado en los respectivas sueros, y la respectiva significancia de la diferencia de proporciones (n=611)

Cobre en suero		**Selenio en sangre**	
Deficiente (<0,6 ppm)	Adecuado (>0,6 ppm)	Deficiente (<80 ppb)	Adecuado (>80 ppb)
82,6% Se deficientes	75,3% Se deficientes	77,7% Cu deficientes	69,5% Cu deficientes
P: 0,07		**P: 0,08**	

Conclusión

La deficiencia de Se en sangre disminuye el porcentaje de incidencia con la mejora del nivel de Cu en suero. Así también, la deficiencia de Cu en suero disminuye la incidencia con la mejora de los niveles de Se en sangre.

Bibliografía

-Van Ryssen, J. B. J.; Van Malsen, P. S. M.; Hartmann, F. 1998. Contribution of dietary sulphur to the interaction between selenium and copper in sheep. The Journal of Agricultural Science, 130(1), 107-114.
-Ataollahi, F.; Mohri, M.; Seifi, H. A.; Pingguan-Murphy, B.; Abas, W. A. B. W.; Osman, N. A. A. 2013. Evaluation of copper concentration in subclinical cases of white muscle disease and its relationship with cardiac troponin I. PloS one, 8(2), e56163.

M5- VARIACIONES DE Zn EN TERNEROS INFECTADOS CON *Mannheimia Haemolytica.* *COMUNICACION*

EM Galarza[1], RM Lizarraga[1], GA Mattioli[1], WR Galván[1], SJ Raggio[2], DE Rosa[1], LE Fazzio[1].
[1]Laboratorio de Nutrición Mineral. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. [2]Estudios Clínicos - Biogénesis Bagó. S.A.
galarzaestebanm@gmail.com

Introducción

El zinc (Zn) es un mineral esencial con un rol catalítico, estructural y regulatorio en la actividad celular de los organismos vivos. La carencia de Zn en bovinos genera disminución en la ganancia diaria de peso, fallas inmunológicas y disminución en la eficiencia reproductiva. El marcador más utilizado para determinar el status de Zn es la concentración de Zn en suero o plasma (zincemia). Existe un acuerdo en considerar normal a valores de zincemia por encima de 90 µg/dl mientras que valores menores a 80 µg/dl indicarían carencia. Sin embargo este marcador suele ser inestable y puede variar sin generar consecuencias en el animal. En roedores, la respuesta de fase aguda, causada por traumas, infecciones o estrés, genera descenso de la zincemia. En bovinos poco se conoce sobre las variaciones de zincemia ante situaciones estresantes y/o de enfermedad. La enfermedad respiratoria bovina (ERB) es la principal causa de muerte en explotaciones de engorde a corral. Si bien la ERB es producto de una compleja interacción entre estrés, virus y bacterias, es ampliamente aceptado que Mannheimia haemolytica (MH) posee un rol central en la etiopatogenia de la enfermedad. El objetivo del presente estudio fue realizar un experimento preliminar para evaluar las zincemias de terneros frente a una infección experimental con MH.

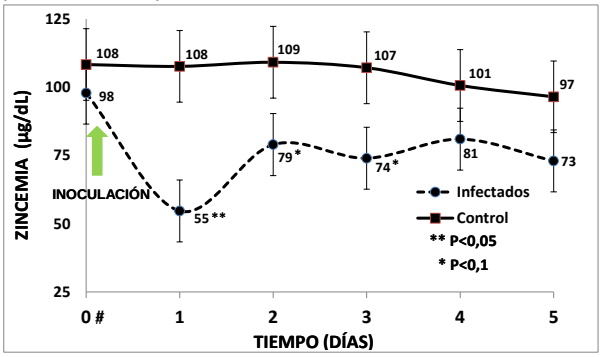
Materiales y métodos

Se realizó un estudio experimental que incluyó 15 terneros machos de 67,7 ± 7,7 kg de peso vivo, clínicamente sanos, de los cuales 9, recibieron 8 mL de un inóculo con una cepa de MH (conteo viable de 6.5 x 10^6 UFC/mL en la fase logarítmica de crecimiento) más 8 mL de solución fisiológica estéril por vía endoscópica intrabronquial (grupo infectado), y a los restantes 6 animales se le depositó un volumen de 16 mL de solución fisiológica por la misma vía (grupo control). Se extrajeron muestras de sangre entera previo a la infección experimental (día 0) y durante los siguientes días (1, 2, 3, 4 y 5). La extracción se realizó por venopunción yugular en tubos heparinizados. A partir del sobrenadante obtenido de la desproteinización del plasma sanguíneo se midió la concentración de Zn por espectrofotometría de absorción atómica de llama (AAnalyst 200 – Perkin Elmer). El diseño estadístico fue completamente aleatorio, y se analizó con un modelo mixto con medidas repetidas (zincemia) en el tiempo con el programa estadístico SAS (9.1). Las variables fijas fueron tratamiento (grupo), tiempo (día) y la interacción entre ambos. La variable aleatoria fue el animal. La separación de medias se realizó mediante el procedimiento SLICE dentro del mismo programa estadístico cuando las diferencias eran significativas en la interacción. Los valores de probabilidad que se consideraron significativos fueron de P<0,05 para efectos principales y de P<0,1 para la interacción, y la tendencia de P<0,1 o P<0,15 respectivamente.

Resultados

De las variables incluidas en el modelo, el tiempo y la interacción tratamiento x tiempo tuvieron un efecto altamente significativo (P<0,01), mientras que el tratamiento presentó una tendencia (P=0.07). La media de los mínimos cuadrados de la zincemia en el día 1 fue estadísticamente menor en el grupo infectado que en el grupo control (P<0,01), en tanto en los días 2 y 3 hubo una tendencia en igual sentido (Figura 1).

Figura 1. Medias de los mínimos cuadrados de las zincemias de los grupos infectados y Control para cada punto en el tiempo.



Día 0: Valor previo a la inoculación.

Discusión

Las zincemias no sólo descendieron, sino que lo hicieron por debajo de 80 µg/dL, límite inferior del rango marginal indicado en la bibliografía (Enjalbert et al., 2006), al igual que en un estudio previo del grupo (Galarza et al., 2017). Se cree que la disminución en plasma se debe a un mecanismo de defensa del organismo para disminuir la disponibilidad de Zn, el cual sería necesario para la proliferación de microorganismos patógenos (Schapiro et al., 2003). La interleuquina 1β y la interleuquina 6 (citoquinas de la respuesta de fase aguda) aumentan la transcripción de ARNm de un transportador de Zn en hepatocitos, el cual introduce Zn al citoplasma, reduciendo su nivel en plasma (Liuzzi et al., 2005). Considerando que la ERB es la principal causa de morbilidad y mortalidad en el período de iniciación en engorde a corral en Argentina (Galvan et al., 2014), el estado clínico de los animales debe ser considerado al momento de interpretar las zincemias.

Conclusión

En este estudio preliminar, las zincemias disminuyeron por debajo del rango de normalidad ante una infección experimental con MH en terneros.

Bibliografía

1. Enjalbert F, Lebreton P, Salat O. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: Retrospective study. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2006; 90(11-12):459-466.
2. Galvan WR, Yacachury N, Streitenberger N; Quiroga MA; Fazzio LE. Lesiones anatomopatológicas de bovinos en engorde a corral de un de un de un establecimiento de la provincia de Buenos Aires. Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires 2014.
3. Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(19):6843-6848.
4. Schapiro JM, Libby SJ, Fang FC. Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(14): 8496-8501.
5. Galarza, EM; Lizarraga, RM; Rearte, R; Raggio, SJ; Mattioli, GA; Fazzio, LE. Variación de las zincemias en terneros con infección respiratoria experimental por *Mannehimia Haemolítica*. VI Congreso Argentino de Nutrición Animal, 28 y 29 de junio de 2017, Buenos Aires, Argentina.

M6- HIPOVITAMINOSIS A CONGENITA EN BOVINOS: PRIMERA CONFIRMACIÓN DIAGNÓSTICA EN ARGENTINA. COMUNICACION

I. Llada[1], J. Migliavacca[2],I. Urrutia[2],J. Cora [2],E. Morrell[1], G. Cantón[1], E. Odriozola[1*]
[1]INTA EEA Balcarce.[2]Actividad Privada. *odriozola.ernesto@inta.gob.ar

Introducción

Los bovinos, al igual que otras especies de animales, son incapaces de sinterizar vitamina A, por lo tanto la deben obtener de fuentes dietéticas. Para los rumiantes en pastoreo, la vitamina A proviene normalmente de las plantas, a partir de sus precursores, los carotenos, que se convierten a la forma activa, retinol, en las células epiteliales de la mucosa intestinal para luego almacenarse en el órgano de reserva, el hígado.

La deficiencia de vitamina A primaria generalmente ocurre en bovinos consumiendo una dieta con escaso o nulo forraje verde, ya sea por el pastoreo durante períodos de sequía o alimentados con raciones de grano o heno sin suplemento vitamínico. Los signos clínicos asociados a la deficiencia pueden comenzar 5 a 18 meses después del consumo de dietas deficientes, dependiendo de las reservas hepáticas del animal. Se describe debilidad, ataxia, ceguera, xeroftalmia, convulsiones y síncope, como signos asociados a la deficiencia. Además, como consecuencia de la deficiencia gestacional de vitamina A puede generar natimortos, mortalidad perinatal asociada a signología nerviosa y ceguera.

El objetivo de este trabajo es describir un caso de hipovitaminosis A congénita diagnosticada en un rodeo de vaquillonas de un tambo de la provincia de Córdoba (Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) del INTA Balcarce).

Materiales y métodos

El episodio ocurrió en un rodeo lechero del departamento San Justo (31°52′S y 62°43′O). Se recopiló información anamnésica y se evaluaron clínicamente terneros afectados. Se realizó eutanasia de un ternero de 2 días de vida afectado clínicamente, se evaluó *post mortem*, recolectando tejidos que fueron fijados en formol tamponado al 10% para análisis histopatológico. Se tomó una muestra de hígado para determinar la concentración de vitamina A mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC – DAD). Se recolectaron muestras de sangre de 6 vaquillonas preñadas y 2 terneros de 2 a 3 días de vida para la determinación de vitamina A mediante HPLC, las que fueron conservadas en tubos con protección contra rayos UV.

Resultados

El rodeo problema se componía de 800 vaquillonas Holando de 24 a 27 meses de edad al parto. Estas vaquillonas desde el nacimiento hasta el primer parto no recibían forraje verde como parte de la dieta: en la guachera recibían leche y balanceado con maíz, pellet de soja; desde el destete, comían heno de alfalfa de mala calidad, silo de maíz y alimento balanceado con maíz, pellet de soja y trigo, y núcleo. Al momento de la visita, el 30% de las 450 vaquillonas paridas, habían presentado terneros con debilidad, ataxia y ceguera. Se había instaurado un tratamiento con vitamina A por vía parenteral y calostrado artificial a los terneros afectados, muriendo entre las 24-48hs, llegando a una letalidad del 77,8%: sólo 30 terneros lograron sobrevivir permaneciendo ciegos. Acorde a las recomendaciones del SDVE, las vaquillonas aún gestantes recibieron una aplicación de vitamina A parenteral, observándose una aparente respuesta favorable, con el nacimiento de (%) terneros normales. El ternero afectado que luego fue eutanasiado, presentaba marcada midriasis y coloración azulada del *tapetum lucidum*, ceguera y dificultad para incorporarse, mostrado incoordinación cuando lograba hacerlo. A la necropsia se observó herniación cerebelar y disminución aparente en el espesor de los huesos del cráneo, los que tenían consistencia blanda. En el análisis histopatológico, se diagnosticó metaplasia escamosa de los conductos eferentes de la glándula parótida, con acantólisis, fibrosis y edema de los mismos. Además, hiperqueratosis de la mucosa ruminal e hiperplasia del epitelio lingual. Se confirmaron bajas concentraciones de vitamina A en la totalidad de los sueros de animales muestreados (vaquillonas y terneros) con valores por debajo a 0,24 mg/L (valor de referencia: 0,25 a 0,6 mg/L). No se detectó vitamina A en el hígado del ternero eutanasiado (límite de detección inferior: 5 UI/100 grs).

Discusión y conclusiones

El análisis en conjunto de los datos anamnésicos, hallazgos clínicos, patológicos y bioquímicos permitió confirmar la presentación congénita de un cuadro de deficiencia de vitamina A, lo que determinó la alta mortalidad perinatal en este rodeo. Si bien no se descartó la presencia de otros patógenos asociados a mortalidad perinatal, en el análisis histopatológico, no se observaron lesiones compatibles con otras noxas.

La ausencia de signos clínicos asociado a la hipovitaminosis A en las vaquillonas, podría indicar una presentación subclínica, lo que confirmaría la mayor susceptibilidad del feto y animales jóvenes a la deficiencia, debido a sus mayores requerimientos.

Este trabajo demuestra la importancia de suplementar con vitamina A al ganado en épocas de prolongadas sequía o encierres largos.

Bibliografía:

Hill, B.D., Holroyd, R.G., & Sullivan, M. (2009). Clinical and pathological findings associated with congenital hypovitaminosis A in extensively grazed beef cattle.Australian Veterinary Journal 87(3), 94-98.

Mason, C.S., Buxton, D., & Gartside, J.F. (2003). Congenital ocular abnormalities in calves associated with maternal hipovitaminosisA. Veterinary Record 155, 213-214.

Parker, E.M., Gardiner, C.P., Kessell, A.E., & Parker, A.J. (2017). Hypovitaminosis A in extensively grazed beef cattle. Australian Veterinary Journal 95(3), 80-84.

Prozesky, L. (1989). The pathology of blindness in new-born calves caused by hypovitaminosis A. The Onderstepoort Journal of Veterinary Research 56(2), 99-109.

M7- EFECTO DE SUPLEMENTACIÓN INYECTABLE CON SELENIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA Y EL PESO EN TERNEROS AL PIE DE LA MADRE

RM Lizarraga[1-2], EM Galarza[1-2], JP Anchordoquy [2], DE Rosa[1], GA Mattioli[1]
[1]Laboratorio de Nutrición Mineral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Univ. Nac. La Plata.
[2] IGEVET e Instituto de Genética Veterinaria "Prof. Fernando N. Dulout" (UNLP-CONICET LA PLATA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata : raulmlizarraga@gmail.com

Introducción

Las carencias minerales son un riesgo potencial en sistemas pastoriles de cría debido a que pueden encontrarse en baja concentración en suelo y forrajes (Suttle, 2010).

Los microminerales son elementos esenciales para los bovinos. El Selenio (Se) representa un elemento de importancia por colaborar en las defensas antioxidantes del organismo formando parte de la conformación de enzimas de gran importancia biológica. Entre las selenoenzimas más importantes se cita la glutatión peroxidasa (GPH-px) encargada de inactivar el peróxido de hidrógeno.

En Argentina existen informes de carencia desde la Cuenca deprimida del Río Salado (CDS) hasta la provincia de Chaco (Rucksan, 1990). La forma clínica más característica de la carencia es la enfermedad del músculo blanco, la cual genera cuadros de debilidad, postración y muertes súbitas en casos agudos. En animales en crecimiento, la menor ganancia de peso de los terneros y novillos es la primera manifestación que conduce posteriormente a la presentación clínica de la carencia.

El diagnóstico más frecuente del estatus de Se en bovinos es la medición de la actividad de la GSH-px en sangre entera, la cual se asocia estrechamente al estatus de Se del animal (Ceballos et al. 1999). Dado que la CDS es una importante zona de cría de Argentina, que se basa en un sistema pastoril extensivo y que la suplementación mineral suele estar limitada a la aplicación inyectable de cobre, la carencia de Se toma carácter de problema potencial, especialmente por el riesgo de carencias subclínicas que afecten el crecimiento de los terneros. Este ensayo se realizó con el fin de evaluar el efecto del Se inyectable sobre la actividad de la GSH-px y el peso de los animales.

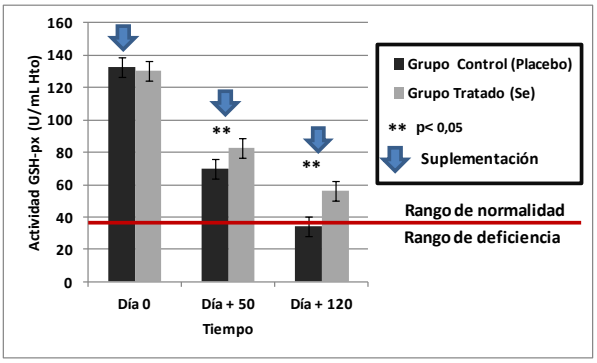
Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en el establecimiento ''Luna Chica'' ubicado en el Partido de La Plata, Provincia de Buenos Aires, con características edafológicas y productivas típicas de la CDS, con son suelos anegables con poco declive hacia el mar y pastizales naturales. El ensayo se realizó entre noviembre de 2017 (Día 0) y marzo de 2018 (destete). Para el ensayo se utilizaron 40 terneros Aberdeen Angus de 80,5 ±20 kg y 90 ±20 días de vida, al pie de sus madres. Al momento del inicio del ensayo (Día 0) se identificaron los animales con doble caravana y se formaron dos grupos al azar (n: 20 por grupo). El grupo tratado (Se) recibió una dosis de selenito de sodio (0,1 mg de Se/kg de peso) por vía subcutánea, mientras que el grupo placebo (Control) recibió el mismo volumen de solución fisiológica estéril. El tratamiento se repitió los días +50 y +120. Previo a cada tratamiento se tomaron muestras de sangre por venopunción yugular y se registró el peso. Las muestras de sangre fueron tomadas en tubos heparinizados, y se enviaron al laboratorio dentro de las 6 hs de extracción para la determinación de microhematocrito y de la actividad GSH-px mediante Kit comercial Ransel (Laboratorio Randox), empleando un espectrómetro UV/VIS (Lambda 25 - Perking Elmer) según el método de Paglia y Valentine (1967) indicado por el fabricante. El diseño estadístico fue completamente aleatorio, y se analizó con un modelo mixto con medidas repetidas en el tiempo con el programa estadístico SAS (9.1). Las variables fijas fueron Tratamiento (grupo), tiempo (día) y la interacción entre ambos. La variable aleatoria fue el animal. Los valores de probabilidad que se consideraron como significativos fueron de $p<0,05$ para efectos principales y de $p<0,1$ para las interacciones. Se consideró una tendencia cuando el valor de p fue menor a 0,1 o a 0,15 para el factor principal o la interacción, respectivamente.

Resultados

Los pesos vivos y las ganancias de peso no se diferenciaron entre los grupos. Existió una interacción significativa entre el tiempo y el tratamiento ($p<0,07$). La actividad GSH-px descendió en ambos grupos a lo largo de ensayo ($p< 0,05$), pero los Días +50 ($p<0,09$) y +120 ($p<0,01$) la actividad fue mayor en el grupo Tratado (Figura 1).

Figura 1: Actividad GSH-px en terneros suplementados con Se (0,1 mg/kg) con respecto a un grupo placebo.



Discución y conclusión

El descenso en la actividad GSH-px está alertando sobre un balance negativo de Se en terneros en pastoreo, coincidente con otros informes dentro de la Provincia de Buenos Aires (Minatel y col., 2004), alcanzando niveles indicativos de carencia (menor a 39,4 U/ mL Hto) en el grupo Control al Día +120 (destete). La falta de diferencias en el peso entre los grupos posiblemente se haya debido a la falta de tiempo con estatus de carencia en el grupo Control. Bajo las condiciones del presente ensayo el tratamiento con selenito de sodio (0,1 mg de Se/kg) no evitó el descenso en la actividad GSH-px, pero fue adecuado para mantener el estatus de los animales tratados por encima del grupo Control y dentro del rango de normalidad.

Bibliografía

1. Suttle NF. 2010. CABI Publishing, Wallingford, UK.
2. Rucksan BE. 1990. Inst. Patobiología, CICV-INTA, Castelar, Argentina , p. 1-46.
3. Ceballos A, Wittwer FG, Contreras PA, Quiroz E, Böhmwal HL. 1999. Pesq. agropec. bras., Brasilia 34 (12): 2331-2338.
4. Paglia DE & Valentine WN. 1967. J Lab Clin Med. 70(1): 158-69.
5. Minatel L, Buffarini MA, Scarlata Villegas EF, Dallorso ME, Carfagnini JC. 2004. Revista Argentina de Producción Animal, 24 (3-4): 225-235

PARASITOLOGÍA

P1- PRIMERA DESCRIPCIÓN DE *Babesia gibsoni* (*sensu stricto*) EN PERROS DE ARGENTINA

D. F. Eiras[1,2], G. Moré[1]
[1]Laboratorio de Inmunoparasitología, Departamento de Epizootiología y Salud Pública, FCV, UNLP, 60 y 118, La Plata, Buenos Aires, Argentina. [2]Laboratorio DIAP (Diagnóstico en Animales Pequeños), Pueyrredón 1098, Banfield, Buenos Aires, Argentina.
e-mail: diegoeiras@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

La piroplasmosis canina es una enfermedad distribuida mundialmente que afecta a los caninos domésticos y salvajes. Es producida por varias especies de protozoarios hemoparásitos y pertenece al grupo de enfermedades transmitidas por garrapatas. En general se caracteriza por producir anemia, fiebre, anorexia, trombocitopenia y esplenomegalia, llegando a ser fatal en algunos casos. Tradicionalmente pueden identificarse al microscopio en base a su morfología intraeritrocitaria como "piroplasmas grandes" (> 2,5 µm) o "piroplasmas pequeños" (< 2,5 µm). Dentro de los primeros encontramos a las especies *B. canis* (*sensu stricto*), *B. vogeli*, *B. rossi*, *Rangelia vitalii* y la innominada *Babesia* sp. que frecuentemente se menciona como *Babesia* sp. (coco). Dentro de los últimos encontramos a *B. gibsoni* (*sensu stricto*), *B. conradae y Theileria annae (Syn. B. microti-like, B. vulpes).* En correspondencia con la amplia distribución del principal vector, *Rhipicephalus sanguineus*, *B. gibsoni* junto con *B. vogeli*, son las dos especies de piroplasmas más distribuidas a nivel mundial. *Babesia. gibsoni*, es endémica en algunas regiones de Asia, estando además reportada en EEUU, Australia y varios países de Europa y África. En Sudamérica ha sido reportada solamente en perros de Brasil. Para identificar la especie de piroplasma la observación microscópica resulta insuficiente. La técnica de PCR es más sensible que la microscopía y permite arribar al diagnóstico de especie. La secuencia del gen para el ARN ribosómico de la subunidad menor o 18S ARNr presenta diferencias entre las especies y permitiría un diagnóstico específico.

En Argentina se ha identificado la presencia solo de *Babesia vogeli* y *Rangelia vitalii.* El objetivo de este trabajo fue describir por primera vez la presencia de *B. gibsoni* en perros de Argentina mediante microscopía y confirmación molecular.

Materiales y métodos

En mes de agosto del año 2014 se procesaron 2 muestras para hemograma provenientes del partido de Ezeiza de un perro de raza Pit Bull Terrier (recogido de la calle 5 meses antes en la provincia de Salta con signos de heridas en la piel y presencia de garrapatas) y un perro mestizo vecino (con el que el Pit Bull había tenido una pelea), remitidas bajo sospecha de un proceso anémico, con cuadro clínico de decaimiento, anorexia leve y palidez de las mucosas. En el examen de los frotis sanguíneos se observó la presencia de merozoítos de tamaño pequeño (<2,5 µm) parasitando los glóbulos rojos. Las muestras de sangre remanente de los hemogramas se conservaron a -20 °C hasta el momento de la extracción de ADN y posterior realización de *nested*-PCR-RFLP y secuenciación.

La extracción de ADN se realizó con el Kit comercial Wizard genomics (Promega, USA), usando 300 µl de sangre como muestra. Las muestras de ADN fueron sometidas a la amplificación parcial del gen 18S ARNr mediante *nested*-PCR. Los productos de amplificación se cortaron con enzimas de restricción HinfI, BslI y HindII (RFLP) a fin de identificar la especie de piroplasma. Además, los amplificados positivos a la *nested*-PCR se purificaron y fueron enviados para su secuenciación a la Unidad de genómica del INTA-Castelar. Las secuencias se alinearon y analizaron con el programa GENEIOUS versión R9. Las secuencias consenso obtenidas se compararon con otras publicadas en el GenBank® usando el programa BLASTn del NCBI.

Resultados

La parasitemia observada por microscopía fue baja (0,1%). En los resultados de los análisis hematológicos se evidenció anemia moderada a grave, de tipo regenerativa. En el leucograma se apreció solamente linfopenia. La *nested*-PCR evidenció un producto de amplificación de aprox. 800 pares de bases en ambas muestras de sangre. Se realizó el corte con enzimas de restricción y se observó el patrón característico de la especie *B. gibsoni* en las dos muestras. Las secuencias obtenidas fueron idénticas entre sí y tuvieron 100% de identidad mediante BLAST con otras secuencias de *B. gibsoni* reportadas en el GenBank (KP666166 y LC012808 de China y Japón, entre otras).

Discusión

El presente trabajo representa el primer reporte de *B. gibsoni* (*sensu stricto*) en Argentina. La infección por este piroplasma produce una enfermedad que cursa con sintomatología moderada, aunque en ocasiones se presenta de modo asintomático. Se acepta que la transmisión está dada por *R. sanguineus* y también se sugiere que *Haemaphysalis longicornis* y *H. bispinosa* pueden participar en el ciclo. Existen evidencias que avalan la transmisión horizontal de esta especie mediante la mordedura, saliva o ingestión de sangre entre perros de lucha, principalmente Pit Bull Terrier o perros de otras razas que fueron atacados por perros de pelea. En el presente trabajo es muy probable que el perro de raza Pit Bull se haya infectado en la provincia de Salta para luego transmitir la infección al perro mestizo durante la pelea. La técnica de *nested*-PCR seguida por RFLP permite identificar a las especies causales de piroplasmosis canina en Argentina. Los resultados fueron corroborados por secuenciación y comparación en BLASTn. Resultan de importancia las investigaciones futuras respecto de la presencia y dispersión de *B. gibsoni* en perros de Argentina al igual que el estudio del mecanismo de transmisión predominante.

Bibliografía

- Jefferies R, Ryan UM, Irwin PJ. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. Vet Parasitol. 144:20–7, 2007.
- Jefferies R, Ryan UM, Jardine J, Broughton DK, Robertson ID, Irwin PJ. Blood, Bull Terriers and Babesiosis: Further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. Aust Vet J. 85:459–63, 2007.

P2- PRIMERA DETECCIÓN MOLECULAR DE *EIMERIA* SPP. Y *E. TENELLA* EN POLLOS INFECTADOS DE ARGENTINA

M. L. Tomazic[1,2]; E. Redondo[1]; J. Schapiro[1]; M. Fernandez Miyakawa[1,2]; A. E. Rodriguez[1]
[1] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)
[2] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
Autor responsable: tomazic.mariela@inta.gob.ar

Introducción

La coccidiosis es causada por los parásitos protozoos de los géneros *Eimeria* e *Isospora* y es una enfermedad de relevancia para los sistemas productivos intensivos como lo es la producción aviar (Constable 2016). En los pollos para carne los daños que produce son de mayor trascendencia cuanto mayor sea el animal, no sólo por las lesiones intestinales que ocasiona - las cuales varían según las especies infectantes y van desde exudados mucosos a hemorragias en distintos sectores del intestino delgado, ciegos y recto- sino porque el período de recuperación necesario no da lugar a que lleguen a la edad de sacrificio. Los síntomas varían según la especie infectante y pueden abarcar desde infecciones sub-clínicas y diarreas leves hasta severas, debido a la destrucción de la mucosa, a veces con sangre y coágulos (Daugschies 2005). La rápida propagación del parásito y la alta replicación produce severa contaminación ambiental y suele ser el foco de infección para los animales. Además, los ooquistes persisten en el ambiente por largos períodos y su eliminación es difícil (Fanatico 2006). En nuestro país el diagnóstico se realiza por examinación de materia fecal y observación de ooquistes de *Eimeria* sp. al microscopio y la determinación de la especie se realiza por morfometría del ooquiste, se considera el período de prepatencia de la enfermedad y se determina un puntaje a la lesión en las necropsias, ya que especies como *E. tenella* producen tiflitis hemorrágica y una notable dilatación de ambos ciegos de las aves afectadas. Si bien es una técnica económica y sencilla, es laboriosa y requiere de personal capacitado. Otra importante desventaja es la imposibilidad de detectar infecciones mixtas y de distinguir algunas especies de *Eimeria*, especialmente aquellas especies sub-clínicas, siendo las que ocasionan el mayor porcentaje del costo de producción dado que impactan en la ganancia de peso y en el índice de conversión alimenticia (De Gussem 2007).

Por todo lo expuesto, la detección molecular de *Eimeria* contribuiría al control de la enfermedad, aportando a un diagnóstico más sensible y específico.

Materiales y métodos

A partir de los ciegos de pollos infectados, diagnosticados por microscopía, se realizó el aislamiento, esporulación y ruptura de ooquistes de *E. tenella*. La técnica se puso a punto utilizándose bolillas de vidrio y agitando vigorosamente en pulsos de 3 minutos a velocidad máxima, previo blanqueo con hipoclorito de sodio y lavado de los mismos. Se determinó el punto de corte mediante el cálculo del porcentaje de ruptura realizado por recuento directo de los ooquistes enteros, remanentes, al microscopio en cámara de Neubauer. Luego, para la puesta a punto de la extracción de ADN, se ensayaron 2 métodos: extracción con fenol/cloroformo/alcohol isomaílico (FCA) y resina Chelex 100 (Ch). Como control positivo se realizó la extracción de ADN mediante la utilización de un kit comercial a partir de una vacuna viva Livacox -utilizada en la producción aviar- que contiene las especies *E. tenella, E. máxima* y *E. acervulina*. PCR: Para la amplificación del ADN de *Eimeria* spp. se utilizaron cebadores de una región del gen de ARNr 18S de ~1800 pb y para *E. tenella* se usaron cebadores específicos de una secuencia caracterizada de una región amplificada (SCAR) de ~ 540 pb.

Resultados

Se pusieron a punto las condiciones de amplificación tanto para la PCR del género *Eimeria* como para la específica de la especie *E. tenella*. A partir del recuento de ooquistes totales, de los cuales se extrajo el ADN y tomando en cuenta el volumen de elución del mismo, se calculó la cantidad de ooquistes agregados a cada reacción de PCR observándose reacción positiva con al menos 4 ooquistes/ul de reacción en ambos métodos de extracción.

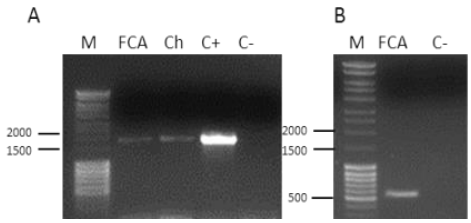


Fig. 1. Caracterización molecular de *Eimeria*. A. Amplificación por PCR del genero *Eimeria,* a partir de muestras aisladas del ciego de pollos infectados extraídas con FCA y Ch. B. Amplificación de *E. tenella* a partir de muestra extraída con FCA. (C+) Control positivo de ADN extraído a partir de la vacuna viva. (C-) Control negativo de reactivos.

Discusión y conclusión

En este trabajo, implementamos por primera vez en la Argentina el uso de técnicas moleculares para la detección del género *Eimeria* con una elevada sensibilidad. También se logró la detección de la especie *E. tenella* mediante la PCR específica. La introducción de estas técnicas permitirá mejorar el diagnóstico sobre todo en casos de coccidiosis subclínicas, y también el estudio de las diferentes especies incluso en muestras con baja cantidad de parásitos sin la necesidad de realizar la necropsia de los animales. Esto contribuye al desarrollo de estrategias de control y prevención. Asimismo, la utilización de estas técnicas posibilitará el estudio de la epidemiología molecular de las especies circulantes, ayudando a complementar el estudio de la enfermedad para el desarrollo a futuro de nuevas vacunas.

Bibliografía

-Constable P. 2016. Overview of Coccidiosis. Veterinary Manual. Merck Sharp & Dhome.
-Daugschies A, Najdrowski M. 2005. Eimeriosis in cattle: Current understanding. J Vet Med Ser B Infect Dis Vet Public Heal 52:417–427.
-De Gussem M. 2007. 16th European Symposium on Poultry Nutrition
- Fanatico A 2006. Parasite Management for Natural and Organic Poultry: Coccidiosis. In: A Publ. ATTRA - Natl. Sustain. Agric. Inf. Serv. www.attra.ncat.org

Subsidiado por: INTA- PNSA 1115056.

P3- DESCRIPCIÓN DE UN CASO DE *TRYPANOSOMA EVANSI* EN UN CANINO DE LA LOCALIDAD DE MONTE CASEROS, PROVINCIA DE CORRIENTES

V. Bazzalo [1], E.F.Dubois [2], V. A. Giaccometti [3], C. N. Pertile [4].
[1] Actividad privada: Laboratorio La Mission Diagnóstico Veterinario, Mercedes, Corrientes. [2] Centro de Investigación y Transferencia (CIT Formosa) CONICET.UNAF, Gobierno de la provincia de Formosa. [3] Litoral Servicios Veterinarios, Monte caseros, Corrientes, [4] Beca INTA-CONICET, EEA-INTA Mercedes, Corrientes
. vbazzalo@hotmail.com

Introducción

El *Trypanosoma evansi* causa una enfermedad conocida como "surra" " o mal de caderas en nuestro país, en relación a la parálisis que produce en el tren posterior de los équidos. Afecta a varias especies de animales domésticos de Asia, África, América Central y Sudamérica La especie hospedadora varía según el área geográfica, pero en particular el búfalo, el ganado vacuno, los camellos y los caballos resultan ser los más afectados, aunque también hay otros animales, incluyendo los salvajes y los cánidos, que son susceptibles, por ejemplo capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) y coatis (*Nasua nasua*) (Herrera et al., 2005). Este flagelado se transmite mecánicamente por diferentes moscas hematófagas, tales como *Tabanidae* y *Stomoxys*, así como por el murciélago vampiro *Desmodus rotondus*. La transmisión también puede ser vertical, iatrogénica y por vía oral (Desquesnes 2013). La enfermedad se manifiesta en los animales susceptibles con fiebre intermitente, anemia progresiva, pérdida de la condición corporal, decaimiento, a menudo se observan edemas, particularmente en las partes inferiores del cuerpo y hemorragias petequiales de las serosas. (Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008). Los signos oculares se observan con mayor frecuencia en perros, con conjuntivitis, lagrimeo, queratitis, opacidad corneal y / o signos hemorrágicos, que pueden conducir a depósitos de fibrina en la cámara anterior del ojo y ceguera. El objetivo de este trabajo es el de reportar el caso de un canino en la localidad de Monte Caseros, asentando antecedentes de esta enfermedad en pequeños animales de la región.

Materiales y métodos

En el mes de noviembre de 2017 el laboratorio "La Mission" recibe un frotis de una PAAF(punción aspiración con aguja fina) de médula ósea canina y sangre con anticoagulante, procedente de la clínica" Litoral Servicios Veterinarios" de la ciudad de Monte caseros En la información anamnésica provista por el veterinario se describe un canino macho de raza galgo de aproximadamente 5 años, que esporádicamente era llevado a zonas rurales de ese municipio, el animal era alimentado ocasionalmente con carne de carpincho(*Hydrochaeris hydrochaeris*). El propietario del animal menciono que había tenido otros perros que murieron con sintomatología similar. El canino presentaba ceguera y un cuadro de adelgazamiento progresivo. Con la muestra de sangre con EDTA, se cuantifico el volumen de células empaquetadas (Hct%) mediante la técnica de micro-hematocrito y se determinó el hemograma (recuento de glóbulos rojos, blancos, hematocrito mediante la técnica de micro-hematocrito y frotis teñido con Metanol-giemsa). Se utilizó la misma coloración para el extendido de médula ósea, el cual se examinó completamente por microscopía para evaluar la presencia de *trypanosoma spp*. Para la identificación del agente se realizó la extracción de ADN genómico de sangre entera por medio de un kit comercial (INBIO Highway). Para el diagnostico por PCR se utilizaron los primers descriptos por Konnai. Los primers utilizados fueron 5´-CTGAAGAGGTTGGAAATGGAGAAG-3´ (FORDWARD) y 5´-GTTTCGGTGGTTCTGTTGTTGTTA-3´ (REVERSE) y generan un amplicon de 151 pares de bases. Los primers se unen a una región conservada de la glicoproteína variable de superficie (VSG) de *T. evansi*. Para la reacción de PCR se utilizaron las condiciones de ciclado descriptas por el autor. Se utilizaron controles positivos y negativos adecuados. Los productos de la reacción fueron analizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se amplificó además por PCR una región hipervariable del gen 18SrRNA para su identificación por secuenciación. Con las secuencias obtenidas se realizó la búsqueda por BLASTn contra la base de datos de NCBI

Resultados

En el hemograma se observó un hematocrito de 48% (VN: 30% -50%). Los valores absolutos de las células blancas mostraron una marcada leucopenia (2450 leucocitos/mm^3 VN: 6000-17000), con neutropenia (1641 neutrófilos/mm^3 VN: 3000-11500) y linfopenia (588 linfocitos/mm^3 VN: 1000-4800); con 147 neutrófilos en banda/mm^3 (VN: 0-300), 24,5 monocitos/mm^3 (VN: 150-1350) y 49 eosinófilos/mm^3 (VN: 200-500). En la observación microscópica de médula ósea y de sangre se hallaron, formas parasitarias fusiformes, de aproximadamente 20-25 micras de largo, con un solo flagelo en un extremo, sin kinetoplasto evidente y un núcleo central, las cuales son compatibles con protozoarios del género tripanosoma Además, la muestra resulto positiva a la PCR-VSG y la secuencia obtenida a partir del fragmento del gen 18SrRNA mostraron un 100% de identidad al *T. evansi* luego de la búsqueda por BLASTn.

Conclusión

El estudio citológico y la prueba de diagnóstico molecular PCR, permitieron la confirmación del diagnóstico de tripanosomiasis y la identificación del protozoario presente. En este caso surge la duda de cómo se infectó el canino ya que aparece la posibilidad de la transmisión por vía oral por consumo de carne de carpincho contaminada. Lamentablemente no pudimos obtener una muestra de la carne consumida para analizarla. Estos datos que surgen de la semiología creemos pueden ayudar al clínico a la hora de sospechar la presencia de esta enfermedad. Otra consideración que hacemos es la de destacar la importancia del estudio citológico del extendido de médula ósea como método rápido, sencillo y eficaz para el diagnóstico de esta enfermedad así como de otros diferenciales, por ejemplo leishmaniosis canina bastante frecuente en nuestra zona.

Bibliografía:

-Herrera, H.M. et al. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a prisitine area of the Brazilian. by *Trypanosoma evansi* in a prisitine area of the Brazilian Pantanal region. Parasitol Res, v.96, n.2, p.121-126, 2005.
- Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008.
-Konnai, S., Mekata, H., Mingala, C.N., Abes, N.S., Gutierrez, C.A., Herrera, J.R.,Dargantes, A.P., Witola, W.H., Cruz, L.C., Inoue, N., Onuma, M., Ohashi,K., 2009. Development and application of a quantitative real-time PCRfor the diagnosis of Surra in water buffaloes. Infect. Genet. Evol. 9,449–452
-Desquesnes, M., Holzmuller, P., D.-H. Lai, A. Dargantes, Z.-R. Lun, and S. Jittaplapong, 2013. "Trypanosoma evansi and Surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects," BioMed Research International, vol., Article ID 194176, 22 pages,

P4- SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PCR COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LA TRICHOMONOSIS VENÉREA BOVINA

J. Soto1; A. Forletti1; E. Lucchesi1; P. Soto1
1 BIOTANDIL (Laboratorio Biológico de Tandil SRL) – Montiel 834, Tandil, Argentina e-mail: pedrosoto@biotandil.com.ar

Introducción

La Trichomonosis Venérea Bovina (TVB) es una enfermedad causada por *Tritrichomonas foetus*, un protozoo flagelado piriforme que produce grandes pérdidas económicas debido a que genera infertilidad y abortos. Debido a su amplia distribución y su importancia económica es substancial tomar medidas para su diagnóstico y control.

El método de referencia para diagnosticar la TVB es el cultivo con la observación microscópica para determinar la presencia del protozoario. Las muestras de rutina para el diagnóstico de la TVB son los raspajes del prepucio del toro. En un rodeo infectado donde se observa repetición de celo o hembras vacías al tacto la muestra de elección es mucus cérvico-vaginal o muestras de abortos.

BIOTANDIL produce un medio semisólido, que ha demostrado ser un excelente medio de crecimiento y transporte (1,2). Teniendo en cuenta que *T. foetus* es anaerobio aerotolerante, se desplaza hacia el fondo del tubo donde encuentra las condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo. A su vez, la consistencia del medio permite mantener al esmegma prepucial con sus detritos celulares y flora contaminante en la parte superior del tubo evitando la mezcla de la muestra en el fondo del tubo como ocurre en caldo. Otra de las ventajas de Trichobiol es que el diagnóstico microscópico se realiza por observación directa del tubo a X100, evitando la aireación y optimizando el tiempo empleado para el diagnóstico comparado con los caldos tradicionales en los cuales cada muestra debe ser montada en un portaobjetos para su observación.

Considerando que pueden crecer otros protozoos en los medios de cultivo, es indispensable la experiencia del observador a la hora del diagnóstico y acompañar a las muestras dudosas de una tinción diferencial rápida (T-15, BIOPUR diagnostics). Alternativamente se ha empleado a la PCR como método confirmatorio para el diagnóstico de *T. foetus* (2).

La PCR ha tenido un gran éxito como técnica complementaria al cultivo con microscopía, motivo por el cual muchos autores la postulan como el futuro método para el diagnóstico de la TVB (3,4). En el presente trabajo nuestro **objetivo** fue determinar la sensibilidad y especificidad de la PCR como método de diagnóstico de la TVB considerando como referencia al cultivo con observación microscópica en Trichobiol.

Materiales y métodos

Se procesaron 17.508 muestras prepuciales, extraídas por veterinarios clínicos mediante raspaje y sembradas a campo en el medio de BIOTANDIL. Posteriormente en el laboratorio, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 7 días con observaciones microscópicas en el fondo del tubo a X100 cada 24hs. Para determinar una muestra positiva se tuvo en cuenta la presencia de protozoarios con morfología y movimientos característicos de *T. foetus*. En muestras dudosas se realizaron observaciones microscópicas a X1000 en portaobjetos con tinción diferencial rápida. Para el reconocimiento de los protozoarios con dicha tinción, se consideraron la morfología del soma, las características estructurales de membrana ondulante, el número de flagelos, la presencia del axostilo y la forma del núcleo. Se extrajo DNA de las muestras que resultaron positivas para el diagnóstico microscópico. Se incluyeron muestras negativas que presentaron crecimiento de protozoarios en el medio de cultivo pero que no coincidieron en morfología, motilidad, etc. con *T. foetus* y muestras negativas sin crecimiento provenientes de los mismos protocolos. Las extracciones de DNA y las reacciones de PCR fueron realizadas como se describió anteriormente (2). Se consideró como negativas a PCR todas las muestras que no amplificaron con los primers TFR 3-4.

Resultados

De las 17.508 muestras, 132 resultaron positivas al diagnóstico microbiológico. Se extrajo DNA de 132 muestras positivas y de 116 muestras negativas. Veinticinco de las muestras negativas presentaron crecimiento de otros protozoarios. En la tabla 1 se observan los resultados de la PCR. Todas las muestras positivas para el diagnóstico microbiológico por cultivo resultaron positivas para los primers TFR 1-2 indicadores de familia *Tritrichomonadidae*. Ciento veintiseis muestras (95,5%) resultaron positivas para los primers TFR 3-4 específicos para la especie *T. foetus*. Del total de muestras negativas con crecimiento, 23 (92%) resultaron positivas para los primers TFR 1-2 mientras que sólo 2 (8%) para los primers TFR 3-4. Ninguna de las muestras negativas sin crecimiento amplificó con los primers específicos de *T. foetus*.

Tabla 1: Resultados de PCR de las muestras positivas y negativas al cultivo.

Cultivo + Microscopía	PCR		
	TFR 1 - 2	TFR 3 - 4	Negativos
Positivos	132/132	126/132	6/132
Negativos con crecimiento	23/25	2/25	23/25
Negativos sin crecimiento	1/91	0/91	91/91
Negativos totales	24/116	2/116	114/116

La especificidad de la PCR resultó del 98,3% mientras que la sensibilidad de la misma fue del 95,5% en relación con el método referencia establecido para el diagnóstico de la TVB.

Discusión y conclusiones

Se analizaron por la PCR muestras prepuciales positivas y negativas al diagnóstico por cultivo. Teniendo en cuenta que las muestras prepuciales se sembraron a campo, la calidad de las muestras representó un desafío para ambas técnicas considerando el exceso de barro y materia fecal que puede presentarse en algunas muestras.

La disparidad en el número de muestras empleadas negativas con respecto a las positivas se debió a que algunos protocolos que ingresaron al laboratorio sólo estaban compuestos por muestras positivas. Todas las muestras positivas amplificaron con los primers TFR 1-2 mientras que 6 de ellas resultaron negativas para los primers TFR 3-4. Estas 6 muestras presentaron mucha contaminación bacteriana. Cuatro de esas muestras no ofrecieron dudas con respecto al diagnóstico microscópico, mientras que 2 resultaron dudosas y se confirmaron positivas por medio de tinción diferencial rápida. Con respecto a las muestras negativas con crecimiento de otros protozoarios era esperable que en su mayoría amplifiquen con los primers TFR 1-2 por ser protozoarios de la misma familia que *T. foetus.* Sólo 2 de estas muestras amplificaron con los primers TFR 3-4. Si consideramos que muchas de esas muestras provenían de un rodeo problema, el valor predictivo positivo aumenta como la probabilidad de que esos animales estuvieran realmente siendo portadores de *T. foetus*.

Finalmente de las muestras negativas sin crecimiento ninguna de ellas amplificó con los primers TFR 3-4 y solo una amplificó con los primers TFR 1-2.

La sensibilidad y especificidad obtenidas de la PCR fueron similares a lo reportado por otros autores (4,5)

La PCR demostró ser una técnica de buena sensibilidad y especificidad complementaria al cultivo con microscopía, en el medio de BIOTANDIL, para el diagnóstico de la TVB.

Bibliografía

1- Lucchesi, E. y col. (1988). AAVLD.
2- Soto, P. y col. (2014). AAVLD.
3- Yao, C. (2013). J. Med. Microbiol., 62: 1-9.
4- Mutto, A. y col. (2006). Vet. Parasitol., 136: 357-61.
5- Mukhufhi, N y col. (2003). Theriogenology, 60 (7): 1269-78.

P5- LÍMITE DE DETECCIÓN DE *TRITRICHOMONAS FOETUS* MEDIANTE PCR Y CULTIVO CON OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

A. Forletti[1]; J. Soto[1]; E. Lucchesi[1]; P. Soto[1]
[1] BIOTANDIL (Laboratorio Biológico de Tandil SRL) – Montiel 834, Tandil, Argentina
e-mail: pedrosoto@biotandil.com.ar

Introducción

Tritrichomonas foetus es un protozoo parásito flagelado agente de la Trichomonosis Venérea Bovina (TVB). Debido a que produce infertilidad y abortos, sumado a su amplia distribución es de gran importancia económica diagnosticar y controlar la enfermedad.

El método de referencia para diagnosticar la TVB es el cultivo con la observación microscópica. Por la condición de portador del toro, las muestras prepuciales son las de mayor frecuencia en las rutinas de diagnóstico. También pueden remitirse al laboratorio muestras de mucus cérvico-vaginal o de abortos provenientes de rodeos infectados donde se observa repetición de celo o hembras vacías al tacto.

El medio de cultivo semisólido de BIOTANDIL, ha demostrado ser un excelente medio de crecimiento y transporte (1,2). La consistencia del medio de cultivo permite retener a las contaminaciones microbianas y a los detritos celulares en la parte superior del tubo preservando un espacio libre de muestra para el crecimiento adecuado de los protozoarios. La observación directa en el fondo del tubo evita la aireación y la mezcla de la muestra así como también reduce los tiempos empleados para el diagnóstico comparado con los caldos tradicionales en los cuales cada muestra debe ser montada en un portaobjetos para su observación. Debido al crecimiento de protozoos no *T. foetus* en los medios de cultivo, es indispensable la experiencia del observador y acompañar a las muestras dudosas de tinción diferencial rápida (T-15, BIOPUR diagnostics).

La PCR ha sido postulada como un método alternativo para el diagnóstico de la TVB debido a la eficiencia diagnóstica como técnica complementaria al cultivo con observación microscópica en nuestro laboratorio (2). En los últimos años se han diseñado nested PCR, qPCR, PCR, etc. basadas en la región amplificada por los primers de Felleisen y colaboradores (3).

En el presente trabajo nuestro **objetivo** fue determinar el límite de detección de *T. foetus* de cada una de las técnicas PCR y cultivo con observación microscópica.

Materiales y métodos

Se utilizaron para este estudio 2 cepas de *T. foetus* (Tf1 y Tf2) aisladas de toro y vaca respectivamente. Ambas cepas fueron identificadas por PCR con los primers TFR 1-2 común a toda la familia *Tritrichomonadidae* y TFR 3-4 específicos de *T. foetus*. Luego de su aislamiento e identificación, las cepas fueron subcultivadas en medio de cultivo sin agar durante 24hs a 37°C. La concentración de protozoos se obtuvo por recuento en cámara de Neubauer y se realizaron 10 diluciones seriadas de los protozoos en solución fisiológica estéril. De cada dilución se realizaron por triplicado dos procedimientos: 1) siembra en medio de cultivo semisólido y 2) siembra en agua destilada libre de DNasas y RNasas. Así se sembraron 1000, 500, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5 y 1 protozoo en cada una de las condiciones descriptas.

Las muestras sembradas en el medio de cultivo fueron incubadas a 37°C durante 14 días con observaciones microscópicas en el fondo del tubo a X100 cada 24hs según lo descripto (1).

De las muestras sembradas en agua destilada se extrajo DNA. Brevemente se incubó a los protozoos sembrados en agua durante 10 min a 100°C, luego se agregó proteinasa K incubando a las muestras a 50°C durante 45min y luego se inactivó a la enzima por ebullición durante otros 10min. El DNA obtenido se amplificó por PCR con los primers TFR 1-2 y TFR 3-4 según lo detallado (2).

Resultados

Con respecto al cultivo en medio de cultivo semisólido se detectó hasta 1 protozoo a las 96hs (en uno sólo de los triplicados) correspondiente a la cepa Tf1. Cinco protozoos fueron detectados en las 3 réplicas a las 72hs. En el caso de la cepa Tf2, 5 y 10 protozoarios fueron detectados en el 66% de las réplicas a las 96hs. Las siembras mayores a 10 protozoos fueron detectadas entre las 48 y 96hs en las 3 réplicas para ambas cepas.

Con respecto a la PCR se detectaron de manera similar a las diluciones con los primers TFR 1-2 y TFR 3-4. Treinta protozoarios fueron detectados en el 100% de las réplicas para ambas cepas. Al menos 1 de los 3 tubos correspondientes a las diluciones de 20, 10 y 5 protozoarios amplificó para ambas cepas. Un protozoo no pudo ser detectado en ninguna de las dos cepas.

Considerando la metodología empleada por otros autores se realizaron diluciones seriadas del DNA extraído correspondiente a 1000 *T. foetus* para ambas cepas. Así se amplificaron 1000, 500, 100, 50, 10, 5 y 1 protozoo por tubo. Cinco protozoos fueron detectados en 2 de los triplicados para cada cepa mientras que 1 protozoo se detectó en 1 de las réplicas para la cepa Tf1. A partir de 10 protozoos se detectó por PCR al 100% de las réplicas para ambas cepas.

Discusión

El cultivo en medio semisólido de BIOTANDIL permitió detectar hasta 5 protozoos en 3 o 4 días de cultivo a 37°C en las cepas Tf1 y Tf2 respectivamente. En el 33% de los casos la cepa Tf1 permitió la detección de hasta 1 protozoario a los 4 días de incubación. Considerando que los tiempos de cultivo para el diagnóstico de la TVB en muestras de campo se llevan a cabo durante 7 días, el cultivo nos permitiría detectar hasta 5 protozoos. Mukhufhi y colaboradores en 2003 reportaron que por raspado de toro infectado se inoculan en promedio 141 *T. foetus* /ml, mientras que Hammond y colaboradores en 1943 reportaron un inóculo de 50 *T. foetus*/ml (4,5). En ambos casos, lo obtenido por estos autores es un inóculo al menos 10 veces superior al límite detectado por el cultivo en medio utilizado por BIOTANDIL.

Por su parte el límite de detección de la PCR está estrechamente ligado al método de extracción de DNA. El método empleado en este ensayo fue seleccionado por ser simple, rápido y de bajo costo, condiciones adecuadas para un laboratorio de diagnóstico. Cuando se emplearon diluciones de *T. foetus* y se extrajo su DNA, el límite de detección de la PCR se encontró en 30 protozoos por tubo.

Algunos autores de la bibliografía han determinado el límite de detección de sus respectivas PCRs mediante diluciones seriadas del DNA de una cantidad conocida de protozoarios. El DNA, en la mayoría de los casos, había sido extraído con kits obteniéndose DNA purificado con un costo muy elevado por muestra. Los límites de detección reportados de estas PCRs se encontraron entre los 100 y los 5 protozoos por tubo (4,6). Empleando la misma metodología (diluciones del DNA a partir de una cantidad conocida de *T. foetus*) pero con nuestro método de extracción, que es 10 veces más económico, el límite de detección fue de 10 protozoos. Este límite de detección fue al menos 5 veces menor que los inóculos provenientes de toros infectados (4,5).

Conclusión:

El límite de detección obtenido con el cultivo en medio semisólido fue de 5 protozoos mientras que el de la PCR fue de 10 protozoos obteniéndose así una mayor detección con la técnica tradicional de cultivo empleada en nuestro laboratorio.

Bibliografía

1- Lucchesi, E. y col. (1988). AAVLD.
2- Soto, P. y col. (2014). AAVLD.
3- Felleisen, R. y col. (1998). J. Clin. Microbiol., 36 (2): 513-19.
4- Mukhufhi, N y col. (2003). Theriogenology, 60 (7): 1269-78.
5- Hammond D. y col. (1943). Am. J. Vet. Res., (4): 143–9.
6- González – Carmona, L. y col. (2012). Rev. Bras. Parasitol. Vet., 21 (3): 201-5.

P6- IDENTIFICACION DE *SARCOCYSTIS* SPP. EN JABALIES (*Sus scrofa*) DEL NOROESTE PATAGÓNICO

E. Helman[1,2], E. Chang Reissig[2,3], A. Dellarupe[1,2], M.C.Venturini[2], G. Moré,[1,2]
[1]Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV, UNLP, [2]Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET),
[3]Estación Experimental Agropecuaria San Carlos de Bariloche, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)
elisahelman@gmail.com

Introducción

La sarcocystosis es una infección parasitaria producida por una o más de las especies del género *Sarcocystis.* Los miembros de este género son protozoarios intracelulares del phylum Apicomplexa, pertenecientes a la familia Sarcocystidae. Presentan ciclos evolutivos indirectos produciendo quistes musculares por reproducción asexual en los hospedadores intermediarios (HI) y ooquistes con esporocistos por reproducción sexual en el intestino de los hospedadores definitivos (HD).

La sarcocystosis porcina es una infección de distribución mundial causada por diferentes especies de *Sarcocystis*, que producen quistes en músculos de cerdos doméstico (*Sus scrofa domestica*) y jabalíes (*Sus scrofa*). Se han reportado 3 especies de *Sarcocystis* que afectan a los suinos como HI, las cuales tienen diferentes HD. Los cánidos, actúan como HD de *S. miescheriana*, los seres humanos de *S. suihominis* y los félidos de *S. porcifelis* (1). La presencia y validez de la especie *S. porcifelis* está en discusión (1). Los suinos se infectan por la ingestión de agua o alimentos contaminados con esporocistos eliminados en la materia fecal de los HD. Hasta el momento se han descripto diferentes tasas de infección en suinos con *S. miescheriana* y *S. suihominis* (2, 3, 4). Sin embargo, la prevalencia de sarcocystosis en suinos de Argentina es desconocida. La identificación y diferenciación de las especies de *Sarcocystis* se realiza mediante estudios morfológicos basados en el tamaño, grosor y estructura de la pared de los quistes y mediante estudios moleculares (1, 4).

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de quistes e identificar las especies de *Sarcocystis* spp. en muestras de músculos de jabalíes provenientes del noroeste de la Patagonia Argentina.

Materiales y métodos

Se obtuvieron muestras de músculos de 96 jabalíes cazados en estancias privadas de las provincias de Neuquén (NQ, n=79) y de Río Negro (RN, n=17). El muestreo abarcó 2 estancias de NQ (en Parque Nacional Nahuel Huapi y en un área próxima al Parque Nacional Lanín) y una de RN (en Pilcaniyeu).

Las muestras se procesaron por homogeneización y observación microscópica en busca de quistes de *Sarcocystis* spp. (5). Para ello, se homogeneizaron 5 gr. de diafragma de cada animal con 50 ml de buffer de fosfato (PBS).

Aquellas muestras en las que se observaron al menos 1 quiste de *Sarcocystis* spp. fueron consideradas “positivas”. Los quistes o porciones de ellos fueron recolectados y observados al microscopio óptico y se realizó un registro fotográfico a 200 y 400 aumentos (Leica 2000). A su vez, los quistes fueron individualizados y se colocaron en microtubos de 1,5 ml (DNAsa free) para extracción de ADN y estudios de PCR y secuenciación. Se amplificó un fragmento del gen 18S rRNA, usando primers y protocolos descriptos previamente (5). En las muestras que resultaron positivas, se purificó el producto amplificado, y fue enviado para su secuenciación en ambos sentidos a la unidad de genómica, Instituto de Biotecnología CICVyA – CNIA –INTA, Argentina. Las secuencias se alinearon con el software GENEIOUS (versión R9). Las secuencias consenso obtenidas fueron analizadas y comparadas mediante BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

En aquellas muestras que presentaron numerosos quistes, se tomaron 10 o más para ser fijados en glutaraldehido al 2 % para microscopía electrónica de transmisión (MET), llevado a cabo por el Servicio Central de Microscopía Electrónica “Shin-Ichiltagaki” de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

Las tasas de infección con *Sarcocystis* spp. entre las 2 provincias muestreadas se compararon estadísticamente mediante la diferencia de proporciones basada en la Distribución Beta, utilizando el paquete R Studio.

Resultados

El 46,88% (45/96) de las muestras analizadas resultaron positivas a la presencia de quistes de *Sarcocystis* spp. Todos los quistes observados presentaron paredes gruesas (< 3 µm).

A su vez, el porcentaje de muestras positivas por observación microscópica fue 46,83% (37/79) y 47,05% (8/17) para NQ y RN, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre ambas provincias para la identificación de quistes en muestras de músculos de jabalíes *(p>0.05*). Se realizó PCR y secuenciación en quistes individualizados correspondientes a 4 muestras, obteniéndose 5 secuencias consenso de 817, 826, 832, 834, 661 pb., las cuales presentaron una homología mayor al 99% con otras secuencias de *S. miescheriana* reportadas previamente.

Se procesaron quistes obtenidos de 4 muestras por MET. Se observó la ultraestructura de la pared de los quistes, con microvellosidades características de la especie *S. miescheriana* en todas las muestras y en 1 muestra se identificó 1 quiste con la ultraestructura propia de *S. suihominis*.

Discusión y conclusión

Las tasas de infección con *Sarcocystis* spp. en las provincias de Neuquén y Río Negro fueron similares. Esto podría deberse a una distribución homogénea de casos en la región o a un cierto sesgo por el desbalance entre las cantidades de muestras obtenidas para cada zona. Los estudios sobre prevalencia de *Sarcocystis* spp. en jabalíes reportados a nivel mundial son escasos. Hasta el momento, se reportó una prevalencia del 25% en USA y del 72% en España (2,3). En este trabajo se obtuvo una prevalencia intermedia en comparación con estos países (46,88%). Por otro lado, considerando lo obtenido por MET y por PCR-secuenciación, se observó que *S. miescheriana* es la especie más prevalente lo cual concuerdan con lo descripto en la bibliografía consultada (2,3,4). Sin embargo, la presencia de la especie *S. suihominis* confirma el riesgo de infección para humanos, especialmente a través del consumo de carne cruda o insuficientemente cocida. Finalmente, se destaca la importancia de realizar un diseño balanceado que permita comparaciones entre diferentes regiones y ambientes ecológicos. Se propone realizar futuros estudios aumentando el tamaño muestral para establecer la prevalencia de las diferentes *Sarcocystis* spp. en suinos domésticos y silvestres de Argentina.

Bibliografía

1- Dubey JP, Calero-Bernal R, Rosenthal BM, Speer CA, Fayer R. 2015. Sarcocystosis of Animals and Humans. 2° Ed. reimp. CRC Press, Boca Raton FL, USA.

2- Calero-Bernal R, Verma SK, Oliveira S, Yang Y, Rosenthal BM, Dubey JP. 2015. *Sarcocystis miescheriana*, a related parasite contracted from canids. Parasitology. 142(4):549-56.

3- Calero-Bernal R, Pérez-Martín JE, Reina D, Serrano FJ, Frontera E, Fuentes I, Dubey JP. 2016. Detection of Zoonotic Protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suihominis* in Wild Boars from Spain. Zoonoses Public Health. 63(5):346-50.

4- Fayer R. 2004. *Sarcocystis* spp. in human infections. Clinical Microbiology Reviews. 17(4):894-902.

5- Moré G, Schares S, Maksimov A, Conraths FJ, Venturini MC, Schares G. 2013. Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis* spp. affecting cattle. Veterinary Parasitology. 197, 85–94.

P7- EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIHELMINTICA EN INVERNADAS BOVINAS DE LA REGIÓN PAMPEANA CENTRAL DE ARGENTINA (RESULTADOS PRELIMINARES)

G. Darico[1]; L. Manzi[1]; V. Anomale[2]; M. Di Niro[2]; H. Lovera[3]; C. Motta[3] , C. Rossanigo[4]; C. Descarga[5]
[1]Estudiante avanzado de Med. Vet. – Fac. de Agronomía y Veterinaria – Univ. Nac. de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
[2]AACREA-Zona Centro-Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
[3]Dpto. de Patología Animal - Fac. de Agronomía y Veterinaria – Univ. Nac. de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
[4]Dpto. Producción Animal. I.N.T.A. – Est. Exp. Agropecuaria INTA San Luis, San Luis, Argentina
[5]Dpto. Producción Animal. I.N.T.A. – Est. Exp. Agropecuaria INTA Marcos Juárez, Córdoba, Argentina
gonzalodarico@gmail.com

Introducción

La helmintiasis gastrointestinal continúa siendo una de las principales limitantes que afectan la productividad de los sistemas de invernada bovina en la región pampeana. Su control se basa en la utilización de drogas, cuya eficacia se ha deteriorado progresivamente durante los últimos años debido a la generación de resistencia (RA). Un reciente estudio de alcance nacional comprobó que en más del 90 % de los sistemas evaluados hay diversos niveles de RA de la ivermectina y que la ineficacia de los bencimidazoles y las situaciones de RA múltiple (lactonas macrocíclicas + bencimidazoles) tienen tendencias crecientes. A su vez, una encuesta sobre prácticas de control helmíntico en establecimientos ganaderos de la región pampeana central, revela que persisten las condiciones de desmanejo de los antihelmínticos (AH) identificadas como factores de riesgo para la generación de RA. El objetivo del trabajo fue determinar la eficacia de los AH fenbendazol, ivermectina y levamisol en rodeos de recría bovina de las provincias de San Luis y Córdoba y determinar los géneros parasitarios presentes.

Materiales y métodos

Entre junio y setiembre de 2017 se seleccionaron cuatro establecimientos identificados por su localización geográfica: Vicuña McKenna (VM), Serrano (S), Tilisarao (T) y Buena Esperanza (BE). Los sistemas realizaban recrías de base pastoril y tuvieron exposición parasitaria desde 2-3 meses previos a la evaluación de RA. En cada establecimiento se utilizaron animales con recuentos de huevos de nematodes en heces (hpg) ≥ 100, divididos en tres grupos homogéneos de 15-20 animales por droga evaluada a dosis de marbete ivermectina 1% (Ivomec®-Merial)(IVM); fenbendazole 20 % (Cyverm F10® Oral-Zoetis)(FBZ) y levamisol Fosfato 22,3 % (Levamic® Mivet SA)(LEV), a los que se les determinó niveles de hpg al inicio del test (día 0) y a los 14 días pos-tratamiento. La eficacia antihelmíntica se evaluó mediante el test de reducción de hpg (TRCH) sin grupo testigo (antes y después), basado en el procedimiento “Antes y después” (Mckenna P. B., 2006), estableciéndose la condición de resistencia si el porcentaje de reducción del hpg era menor al 95%, y el límite inferior del intervalo de confianza del 95% estuviera debajo del 90%. Los niveles de hpg se determinaron mediante la técnica de Mc Master modificada (Roberts y O’ Sullivan, 1949) y los géneros helmínticos por coprocultivo

Resultados

En los sistemas de VM y S se comprobó un elevado nivel de ineficacia de la IVM, alcanzando en el último un valor nulo. Por el contrario, en T y BE la eficacia de la IVM estuvo por encima del 95 % (Cuadro 1). *Cooperia* spp. (17-58 %) y *Haemonchus* spp. (42-83 %) fueron los géneros recuperados en los cultivos postratamiento con IVM de VM y S. En cuanto al FBZ, sólo se comprobó una eficacia de nivel crítico en Tilisarao, con participación de *Ostertagia* spp. (37 %) y *Cooperia* spp. (63 %) en el residuo de géneros postratamiento. El LEV tuvo buena eficacia en todas las evaluaciones. En los cuatro establecimientos, el perfil inicial de géneros estuvo compuesto por *Cooperia* spp., *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. y *Trichostrongylus* spp.

Cuadro 1: Eficacia de las drogas utilizadas

Establecimiento		LEV	FBZ	IVM
V. Mc Kenna (n=15)	% RCH	98,5	99,3	68,7
	hpg día 0	314,3	274	280
	hpg día 15	2,1	4	87,5
Serrano (n=20)	% RCH	99,7	99,2	0
	hpg día 0	820	812	1055
	hpg día 15	2	6,5	1450
Tilisarao (n=20)	% RCH	99,3	94,6	96,4
	hpg día 0	236,5	236,7	228,9
	hpg día 15	1,8	12,8	8,3
B. Esperanza (n=20)	% RCH	99,7	98,8	97,9
	hpg día 0	1132,5	1065	1430
	hpg día 15	3	12,8	30,7

Discusión y conclusiones

La ineficacia de la IVM en S y VM concuerda con los reconocidos hasta el presente en el país, aunque el nivel extremo de Serrano no es frecuente. Si bien la eficacia de la IVM en Tilisarao y B. Esperanza está en el rango de niveles aceptables, debería ser atendida la evolución del valor obtenido en T. La eficacia del FBZ (94,6 %) en Tilisarao es claramente crítica. Los elevados porcentajes de reducción de hpg con FBZ en S, VM y BE son un resultado importante. A su vez, la eficacia del LEV coincide con el comportamiento comprobado hasta el presente en el país. Con respecto a los géneros helmínticos, las exclusivas presencias de los géneros *Cooperia* spp. y *Haemonchus* spp. en las evaluaciones post-ivermectina coinciden con los antecedentes en el país y confirman la creciente incorporación de *Haemonchus* spp. en el perfil de resistencia a esta droga. Por su parte, el residuo de géneros post-FBZ de Tilisarao también concuerda con lo reconocido en el país como sus componentes de resistencia. En términos generales, el perfil de RA obtenido puede considerarse aproximado al de otras regiones del país, aunque es necesario realizar mayor cantidad de evaluaciones para confirmar si es representativo de la problemática de RA en la región considerada.

Bibliografia.

-Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Veterinary Parasitology, 44 (1992) 35-44.
-Henriksen A. A. ; Korsholm H. 1983. A method for culture and recovery of gastrointestinal strongyle larvae. Nord. Vet. Med., 35:429-430.
- Mckenna P. B., 2006. Further comparison of faecal egg count reduction test procedures: Sensitivity and specificity. N. Z. Vet. J., 54: 362-366.
-Morales G. y Pino L. A.. 2009. Nematodes parásitos de los rumiantes domésticos en Venezuela: diagnóstico y control. Editado por Laboratorio de Diagnóstico Veterinario “Aliani”. Impreso en Talleres Gráficos Dot Print C.A, Caracas; 143 pp.

P8- DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE FÉLIDOS SILVESTRES MANTENIDOS EN CAUTIVIDAD EN LA REGIÓN DEL NORDESTE ARGENTINO

T. Rigonatto[1]; M. E. Garcia Denegri[1]; M. E. Revidatti[1]; A. S. Feldmann[1]; L.S. Basualdo[1]
[1]Catedra de Zoología y Ecología F.C.V-U.N.N.E.
trigonatto@vet.unne.edu.ar

Introducción

Entre los numerosos problemas de sanidad que afectan a los félidos silvestres, las infestaciones parasitarias gastrointestinales y ectoparasitosis se destacan como algunos de los más frecuentes. Los efectos que producen varían de trastornos subclínicos hasta la muerte. Además, estas infestaciones interfieren en el comportamiento y adaptación al ambiente, perjudicando en gran medida a las poblaciones de aquellos animales. Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue determinar cuáles son los parásitos presentes en los félidos silvestres mantenidos en cautiverio en distintos Complejos Ecológicos del NEA. Se realizó un estudio retrospectivo donde se analizaron los informes diagnósticos de muestras de materia fecal realizados por el Servicio Diagnóstico de la Cátedra de Zoología y Ecología. En los complejos el tratamiento se realiza posterior a un análisis coprológico y se administran los fármacos recomendados según los resultados obtenidos. Vale aclarar que los animales son mantenidos en parejas o individualmente en recintos que reciben limpieza en forma matutina diariamente, de allí la importancia de nuestras recomendaciones.

Materiales y métodos

Este trabajo fue realizado en el marco del Proyecto de Investigación de Ciencia y Técnica llevado a cabo por la Cátedra de Zoología y Ecología de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE. Se evaluaron 18 informes diagnósticos confeccionados durante el periodo de marzo a diciembre de 2017, correspondientes a 85 muestras pertenecientes exclusivamente a un grupo de pequeños y grandes félidos de interés.

Las especies estudiadas fueron: gato montés (*Leopardus geoffroyi*) n=27, gato moro (*Puma yagouaroundi*) n=5, puma (*Puma concolor*) n=12, yaguareté (*Pantera onca*) n=12, león (*Pantera león*) n=6 y tigre de bengala (*Pantera tigris tigris*) n=23.

Las muestras de materia fecal fueron evaluadas por la técnica de flotación de Willis y observadas con microscopio óptico efectuando la observación con 400 a 600 aumentos (40X a 60X). El material biológico remanente se desechó en bolsas rojas de residuos patológicos.

Para la obtención de parásitos externos, se inspeccionó a cada animal y se realizó raspado de piel, colocando sobre portaobjeto para su posterior observación al microscopio.

Resultados

De las 85 muestras evaluadas (31,76%) fueron positivas. De los parásitos encontrados *Ancylostoma spp*. fue el de mayor prevalencia (33,33%) hallado en gato moro, gato montés y puma. Además, se observó la presencia de *Toxocara cati* (22,22%) en yaguareté y tigre de bengala. El género *Isospora spp*. fue encontrado con una prevalencia del 22,22% en gato montés y tigre de bengala. Con una menor proporción (11,11%) se encontraron huevos compatibles con *Toxascaris leonina* en gato montés y león. Cabe señalar que un 18,52% de los animales parasitados se encontraban en estado de multiparasitismo hallándose en gato montés *(Isospora spp.- Sarcoptes spp.- Toxascaris- Ancylostoma spp.)*; en gato moro *(Isospora spp.* y *Ancylostoma spp.*) y además en tigre de bengala (*Isospora spp.* y *Toxocara spp*.) cuadro nº 1. En relación a ectoparásitos, se hallaron ácaros de la sarna del género Sarcoptes spp. con un 25,93% de eventualidad en gato moro y gato montés.

Discusión

En la práctica rutinaria del laboratorio de parasitología en la cátedra, cuando se desea hacer de forma rápida un examen parasitológico se utiliza el examen cualitativo por el método de flotación con las muestras de materia fecal. En este estudio se determinó la presencia de diferentes parásitos que afectan a animales silvestres mantenidos en cautiverio.

Parásitos	Ancylostoma	Toxocara	Toxascaris	Isospora	Sarcoptes	Multiparasitismo
Prevalencia %	33,33	22,22	11,11	22,22	25,93	18,52
Especies de félidos	Gato moro	Yagua-reté	Gato mon-tes	Gato mon-tes	Gato moro	Gato mon-tes
	Gato mon-tes	Tigre de Benga-la	León	Tigre de Benga-la	Gato mon-tes	Tigre de Benga-la
	Puma					

Cuadro nº 1 (parásitos encontrados, prevalencia y especies en las que se encontraron)

Por su porcentaje de prevalencia se observa que sus formas infestantes son muy resistentes en el medio y de allí radica la importancia del control ambiental por estas parasitosis. Se confirmó la presencia de parásitos zoonóticos como *Toxocara cati y Toxascaris leonina,* ambos con potencial desarrollo de larva migrans visceral. En orden de importancia, se halló el género *Ancylostoma spp*., que produce larva migrans cutánea, lo que representa un riesgo de contaminación por dichas entidades parasitarias en aquellas personas en permanente contacto con los recintos de los animales infestados.

Debido a que los parásitos encontrados presentan formas infestantes resistentes en el medio y que la limpieza diaria de los recintos no resulta un control eficiente en la eliminación de las especies parasitarias halladas, se sugiere realizar la técnica del flameado posterior a la limpieza matutina como método de control para huevos, larvas y ooquistes. Fernández y *col*. (2012) observaron resultados favorables, logrando disminuir e incluso controlar a los parásitos en los recintos bajo tratamiento flameados, con intervalo de 10 días durante 120 días.

Conclusión

La prevalencia de parásitos registrados en especies de felinos silvestres constituyen: la más elevada para *Ancylostoma spp.* (33,33%), *Toxocara cati* (22,22%), *Sarcoptes spp.* (25,93%), *Isospora spp*. (22,22%) y *Toxascaris leonina* (11,11%). Estos hallazgos en zoológicos se deben principalmente a los factores climáticos que favorecen el desarrollo de los parásitos, como también la permanencia de los animales en cautiverio en un mismo sitio de alojamiento durante meses e incluso años (Polo y *col*., 2007). Con el uso del flameado en los recintos de los félidos, se podría evitar el uso frecuente de antiparasitarios, disminuyendo así la posibilidad de que los parásitos adquieran resistencia a los fármacos y afecten la salud de los animales.

Bibliografía

-Fernández J, Calonga L, Chirife C. (2012). Flameado como método de control de parásitos gastrointestinales en los recintos de grandes felinos del Zoológico margen derecha (md) de la Itaipú binacional. *Compend. cienc. vet*. 02 (01): 12 – 16.

-Polo JL, Mackensie M, Porras JA. (2007). Prevalencia de parásitos gastrointestinales en las aves de los órdenes galliformes y columbiformes mantenidas en el Parque Zoológico Nacional de Cuba. Redvet.

-Lucio Fabián Beltrán-Saavedra, Pablo Martin Beldomenico, José Luis Gonzales. (2008). Estudio Coproparasitológico de animales silvestres en cautiverio con destino a relocación en Santa Cruz, Bolivia.

P9- EFECTO ANTIHELMÍNTICO *IN VITRO* DE EXTRACTOS VEGETALES DE LA FAMILIA *FABACEAE* SOBRE HUEVOS Y LARVAS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*

J.H. Schapiro [1,2]; G.E. Morici [1,2]; L. Di Ciaccio [3,5]; A. Salvat [3]; M.F. Bruttomesso [1,2,5]; R.H. Fortunato [4,5,6].
(1) Área de Parasitología, Instituto de Patobiología, CICVyA INTA Castelar. (2) Cátedras de Parasitología y de Enfermedades Parasitarias de la Escuela de Veterinaria de la Universidad del Salvador. (3) Laboratorio de Toxicología, Instituto de Patobiología, CICVyA INTA Castelar. (4) Instituto de Recursos Biológicos, CIRN INTA Castelar. (5) CONICET. (6) Facultad de Agronomía y Ciencias Alimentarias, Universidad de Morón.
E-mail: schapiro.javier@inta.gob.ar

Introducción

Las infecciones por nematodos gastrointestinales en ovinos están ampliamente distribuidas y se consideran una de las principales causas de pérdidas en producción. Debido a los altos índices de resistencia antihelmíntica existe un marcado interés en las estrategias no químicas de control de los parásitos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antihelmíntico *in vitro* de 11 extractos vegetales de plantas de la familia *Fabaceae*, sobre una cepa pura de *Haemonchus contortus*.

Materiales y métodos

Extractos vegetales (EV) y su elaboración: pertenecen a especies de plantas de la familia *Fabaceae* provenientes de la flora nativa Argentina que crecen en las regiones fitogeográficas Yunga y Chaco. Las muestras recolectadas fueron desecadas a temperatura ambiente y luego molidas. Para la extracción, se mezclaron 10 g del material vegetal con 100 ml de metanol que se mantuvieron macerando durante 48 h en oscuridad. Transcurrido ese período, se filtró la solución y se llevó al evaporador rotatorio con vacío (40-42 °C). Se procedió a llevar la solución a una concentración de 80 mg/ml a la que se le adicionó dimetilsulfóxido (DMSO) para su conservación en freezer a -35 °C hasta el momento de su uso.

Aislamiento de huevos y de larvas infectivas (L_3):
Transcurridos 21 días de la inoculación experimental con la cepa pura de *H. contortus*, se extrajo materia fecal del recto del animal dador mediante bolsas plásticas. En el laboratorio se les agregó agua tibia (± 40 ºC), se homogeneizó y disgregó a mano. Luego, se filtró esa solución a través de 4 tamices (60, 80, 200 y 500 meshes) y se transfirieron a tubos cónicos de centrífuga. Se realizaron dos centrifugaciones (2000 rpm durante 10 minutos) con agua corriente y dos con solución hipertónica de sal para clarificar la muestra. Por otra parte, las L_3 fueron recolectadas de los coprocultivos a partir de materia fecal del animal dador.

Test de eclosión de huevos (EHA):
Consiste en incubar una cantidad conocida de huevos de *H. contortus* de pocas horas de eliminados (frescos, no larvados) frente a concentraciones seriadas de un EV con potencial actividad antihelmíntica. El soporte utilizado fueron placas de cultivo celular Falcon™ de 24 pocillos de fondo plano con tapa. Se evaluaron 6 concentraciones de cada extracto vegetal (250 µg/ml; 125 µg/ml; 62,5 µg/ml; 31,25 µg/ml; 15,62 µg/ml y 7,80 µg/ml) con 2 réplicas cada una, además un control negativo (agua) y otro de DMSO. La fórmula empleada para calcular el porcentaje inhibitorio de la eclosión de huevos en cada ensayo fue la siguiente:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{100 \times \text{número de huevos}}{\text{número de huevos + larvas}}$$

Test de inhibición de la migración larval (LMIA): se basa en medir la capacidad migratoria de las L_3 a través de un dispositivo de filtros con una malla de nylon de 28 µm luego de haber estado en incubación con concentraciones seriadas de un EV. El cálculo del porcentaje de migración larval se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{100 \times \text{número de larvas no migradas}}{\text{número total de larvas}}$$

Resultados

Como se observa en la tabla 1, hubo una clara respuesta dosis dependiente, superando en algunos casos el 20 % de inhibición. Los mayores porcentajes se produjeron en aquellos pocillos donde los huevos y las larvas estaban enfrentados con las mayores concentraciones del EV, y este valor fue decreciendo a medida que disminuían las concentraciones hasta alcanzar un valor mínimo en el último pocillo.

Tabla 3. Porcentajes de inhibición en las técnicas de eclosión de huevos (EHA) y en la de inhibición en la migración larval (LMIA).

Especie	Concentraciones (µg/ml)											
	250		125		62.5		31,25		15,62		7,8	
	EHA	LMIA	EHA	LMIA	EHA	LMIA	EHA	LMIA	EHA	LMIA	EHA	LMIA
A438	23,2	26,2	16,7	20,3	12,8	12,7	9,72	11,9	9,41	11,3	9,76	10,2
A442	24,4	15,8	20,3	13	10	12,1	10,4	11,7	10,4	11,5	9,76	11,3
A446	26,6	13,8	21,4	13,8	13,8	11,4	10,6	11,1	10,5	10,2	9,89	10,2
A447	23,7	14,8	18,3	13,8	10,1	12,7	10	10,8	9,86	10,7	9,64	10,1
A448	25,2	13	21,2	10,5	12,8	10,3	12,2	10,1	11,1	10	10,3	10
A449	20,2	12,2	15,4	11,5	12,5	10,8	12,4	7,81	10,2	6,38	9,59	6,12
A452	23,6	14,8	19,4	13,5	18,5	10,2	12,9	8	10,8	6,67	10,5	6,38
A453	29,5	15,4	19	13,2	16,2	10	9,89	8,57	9,8	8,33	9,77	7,5
A8	30,1	13,7	25,3	12,2	23,9	9,09	20,7	7,89	17,2	7,41	14,6	7,14
A9	31,5	11,5	22	10,7	16,3	10,2	13,8	7,89	11,1	6,52	10,1	6,12
A256	26,4	14,3	16,2	8,57	15,2	8,33	11,8	6,67	10,3	6,45	9,68	5,88

Discusión y conclusión

Se logró hacer un screening de varios EV con el fin de identificar a los que tienen efecto antihelmíntico actuando sobre procesos concretos como la eclosión de huevos y la migración de larvas. Los resultados indican que las técnicas utilizadas fueron adecuadas y confiables para el screening primario de sustancias con actividad nematodicida. Las especies de la familia *Fabaceae* demostraron ser potenciales candidatos que pueden sumarse al control de los parásitos, pero se necesitan estudios adicionales *in vivo* para confirmar los resultados preliminares obtenidos.

Bibliografía

-Athanasiadou S, I Kyriazakis, F Jackson & RL Coop (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. Veterinary Parasitology 99: 205-219.

-Coles GC, C Bauer, FHM Borgsteede, S Geerts, TR Klei, MA Taylor & PJ Waller (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.). Methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of Veterinary importance. Veterinary Parasitology (44): 35-44.

-Githiori JB, S Athanasiadou & SM Thamsborg (2006). Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants Veterinary Parasitology 139: 308-3.

P10- *Trypanosoma vivax* EN UN RODEO LECHERO: SEGUIMIENTO Y ESTUDIO DE UN CASO

A. Abdala[1]., G. Suárez Archilla[1], N. Welschen[1], C. Camussone[2]
1 EEA INTA Rafaela, 2 CONICET.
abdala.alejandro@inta.gob.ar

Introducción

El *Tripanosoma vivax* es un hemoparásito que afecta animales ungulados domésticos y silvestres en África, Centro y Sud América, causando importantes pérdidas económicas (Dávila *et al.* 1998). El parásito es principalmente transmitido por la mosca tsetse y otros insectos hematófagos en África. En el nuevo mundo la mosca brava (*Stomoxis calcitrans*) y los tábanos (*Tabanidae*) serían los responsables de la transmisión mecánica entre animales infectados y sanos. La enfermedad cursa con anemia, emaciación y puede causar la muerte de los animales. El primer reporte en Argentina de *T. vivax* fue en el año 2006, en bovinos de carne de la provincia de Formosa (Monzón *et al*.2008). Durante el verano 2016/17 se produjeron varios brotes en tambos del departamento Castellanos de la provincia de Santa Fe. Los mismos se caracterizaron por producir abortos, diarreas, disminución de la producción, muerte y descarte prematuro de vacas. El objetivo de este trabajo fue realizar un seguimiento epidemiológico de un brote de *T. vivax* en un rodeo lechero.

Materiales y métodos

Se trabajó con un rodeo lechero de 200 vacas totales del distrito de Ataliva (S. Fe), donde *T. vivax* (diagnosticado por observación de frotis y confirmado por PCR) produjo un brote en el otoño de 2017. Durante el mismo se registró la muerte de 17 animales, igual cantidad de abortos, disminución de la producción láctea del 37% respecto al mismo mes del año anterior, descarte prematuro de 20 vacas por mala condición general y gastos de tratamiento de 20 US$ por animal. Como medida de control se aplicó diaceturato de diaminazene a la totalidad de las vacas. Pasado el brote y antes del inicio del verano siguiente, se seleccionó un grupo de 15 vacas sin registro de signos clínicos de tripanosomosis y que, al igual que el resto del rodeo, habían recibido tratamiento. A este grupo de animales (centinela) se lo evaluó quincenalmente entre el 13/11/17 y el 1/6/18. Se registró la temperatura rectal y se obtuvo una muestra de sangre con anticoagulante. Durante dicho período, ante la sospecha de signos clínicos de enfermedad en el resto de los animales del rodeo, se aplicó tratamiento, previa extracción de sangre con anticoagulante para observación microscópica de la presencia de *T. vivax*.

Las muestras de sangre se procesaron en laboratorio dentro de las 3 horas de extraídas. Se realizó observación de frotis finos (FF) coloreados con Giemsa y se determinó el volumen del paquete celular (PCV) a través de la técnica de microhematocrito. Sobre el mismo tubo de microhematocrito se realizó la búsqueda de tripanosomas por observación de movilidad en la interfase glóbulos blancos-plasma (buffy coat) descripta por Woo (1974). La presencia de *T. vivax* se confirmó mediante técnica de PCR (Cortez *et al*., 2009)

Resultados

Se realizaron 14 observaciones sobre el grupo centinela. En solo una de ellas (1/6/18) se detectó *T. vivax* en una vaca, presentando temperatura corporal (38,7°C) y PCV (30%) normales. El mismo se encontraba próximo al parto y no había presentado signos clínicos en el día del muestreo, ni en los previos. Se indicó su tratamiento, a fin de evitar un posible aborto o el desencadenamiento de signos clínicos de la enfermedad. El resto de los animales centinela no manifestó signos clínicos de enfermedad durante todo el período, ni se observaron parásitos, comportándose sus parámetros de temperatura y PCV dentro de rangos normales.

Dos animales pertenecientes al rodeo lechero, fuera del grupo centinela, presentaron durante la primera semana de enero de 2018, decaimiento y disminución de la producción láctea. A ambos se les midió la temperatura rectal, se les extrajo sangre para PCV y FF, y se los trató con diaceturato de diaminazene. En solo uno de ellos se observó hipertermia (40°C), PVC de 24% y se detectó una alta parasitemia de tripanosomas, por microscopía. A pesar de haber recibido tratamiento, dicho animal no recuperó su nivel de producción láctea ni su condición corporal, por lo cual fue descartado.

Discusión y conclusión

La detección de *T. vivax* en solo un animal del grupo centinela y la presencia de solo un caso clínico de tripanosomosis en el resto del rodeo podría deberse a diversos factores: 1- La baja circulación del parásito en el rodeo. Esto puede atribuirse a una elevada inmunidad en los animales como consecuencia del brote sufrido el año anterior. Por otra parte se detectó una importante sequía durante los meses de diciembre a marzo, con la consiguiente baja en la población de tábanos y mosca brava durante el período de observación. 2- La baja sensibilidad de las técnicas utilizadas para el diagnóstico de*T. vivax,* en casos de parasitemias muy bajas (Nantulya, 1990). Esto pudo haber sido una limitante para la detección de animales portadores o nuevas infecciones, que no evidenciaron signos clínicos. Sin embargo, estas técnicas son las únicas disponibles actualmente en Argentina. En este estudio, su aplicación unida a la habilidad del personal del establecimiento en reconocer signos clínicos permitió detectar tempranamente un caso clínico fuera del lote centinela.

A pesar del poco tiempo transcurrido desde su aparición en la zona central de Santa Fe, el comportamiento de la enfermedad coincidiría con lo descripto por varios investigadores (Osorio *et al*. 2008). Luego de su aparición como “ola epizoótica” caracterizada por brotes con severas pérdidas, la incidencia de casos clínicos tiende a decrecer en los meses subsiguientes, debido a los tratamientos y al aumento de la inmunidad en los bovinos. Esto daría lugar a períodos “inter epizootias” caracterizados por baja cantidad de parásitos en sangre, durante los cuales se hace difícil su detección por las técnicas directas de observación. Sin embargo, la existencia del parásito en la población bovina podría ser monitoreada por la presencia de anticuerpos que perduran varios años (Osorio *et al*. 2008). Transcurrido el tiempo, esta seroprevalencia puede caer por debajo del 20%-30%. Esto, sumado a un aumento de la población de vectores, inmunosupresión en la población bovina por factores estacionales y presencia de portadores, podría desencadenar una nueva “ola epizoótica”.

Frente a esta situación se hace indispensable contar con una herramienta de diagnóstico serológico, que permita monitorear la prevalencia de infección en los rodeos afectados y su evolución en el tiempo. También podría ser utilizada para detectar reproductores portadores que sean comercializados, evitando su difusión a otros rodeos o zonas no afectadas del país.

Bibliografia

-Cortez AP. 2009. Mol Cell Probes. 23:44-51.
-Dávila A M R. 1998. Revue Élev. Méd. Pays. Trop. 51:1-7
-Nantulya V M. 1990. Rev. Sci. Tech. Jun ,9: 357-367.
-Monzón C M. 2008. Vet. Arg. XXV 247: 492-498.
-Osorio *et al*. 2008. A review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 103 (1): 1-20.
-Woo P T K. 1974. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 58:319-326.

P11- DIAGNÓSTICO DE LA RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA EN PEQUEÑOS ESTRÓNGILOS DE LOS EQUINOS. EL PERÍODO DE REAPARICIÓN DE HUEVOS EN ANIMALES JÓVENES Y EN ADULTOS

G. Caffe[1], B. Paz Benard[1], J. Cerutti[1], M. Signorini [2-3], LG.Cooper[1], OS. Anziani[1-3 (*)]
[1] Universidad Católica de Córdoba, Argentina [2] CONICET, Argentina. [3] EEA INTA Rafaela, Argentina.
(*)Correo electrónico: anziani.oscar@inta.gob.ar

Introducción. El método más difundido en el mundo para determinar la eficacia de todos los tipos de antihelmínticos bajo condiciones de campo es un test *in vivo* conocido como test de reducción en el conteo de huevos (TRCH), el cual compara el número de huevos por gramo de heces (hpg) antes y después del tratamiento. En la especie equina, la documentación de la resistencia de los pequeños estrongilos a las lactonas utilizando este test, han sido muy escasos. Sin embargo la eficacia reducida de estas moléculas, medida por un acortamiento en el período de reaparición de huevos (PRH) luego del tratamiento, parece estar emergiendo en varios países del mundo. La relación entre la edad de los animales y el PRH no ha sido dilucidada y hasta el momento las evidencias existentes son conflictivas. El objetivo del presente trabajo es comunicar las observaciones efectuadas sobre la eficacia (TRCH) y el PRH luego del tratamiento con ivermectina en equinos adultos y jóvenes del mismo sexo (yeguas madres y sus hijas) parasitadas naturalmente por pequeños estrongilos y mantenidas bajo las mismas condiciones de campo y manejo en un establecimiento de la provincia de Tucumán.

Materiales y métodos. Como animales experimentales se utilizaron 28 animales (14 yeguas y 14 potrancas). La edad de las yeguas osciló entre los 6 a los 17 años mientras que la correspondiente a las potrancas fue de 9 a 12 meses. Ambas categorías habían permanecido juntas hasta aproximadamente los 60 días y luego se mantuvieron en un esquema de rotación pero sobre las mismas pasturas. El criterio de inclusión al estudio fue contar en el día del tratamiento con hpg igual o superior a 200. Los animales fueron asignados a dos grupos de 14 animales cada uno y tratados en el día 0 de la experiencia en forma oral con 0.200 mg / kg de ivermectina (Equvalan ® pasta, Zoetis).Se consideró como eficacia de la droga a reducciones en el TRCH > 95 %. Las diferencias en los valores del hpg de las potrancas y las yeguas al día del tratamiento con ivermectina fueron analizados por el test de Wilcoxon. Luego del tratamiento se utilizó la regresión lineal de Cox considerando a los valores del hpg como resultados y al peso y la edad de las yeguas madres y sus potrancas como factores confusores (programa Infostat, Universidad Nacional de Córdoba).

Resultados. La eficacia clínica de la droga en la segunda semana post-tratamiento osciló entre el 99.9 y el 100% en yeguas y potrancas respectivamente. El PRH (considerado como el período post- tratamiento en que se alcanza el 10% del hpg pre-tratamiento o una reducción del mismo < 90 %) fue de seis y siete semanas para las potrancas y yeguas madres respectivamente (p=0.001). En la sexta semana, las potrancas mostraron poseer 11.74 veces más riesgo (IC 95 % = 2.58-53.38) de reaparición de huevos que las yeguas madres (Tabla 1).

Tabla 1. Eficacia comparativa en el TRCH luego de la administración oral de ivermectina en yeguas madres y sus potrancas y período de reaparición de huevos en cada grupo.

Categoría Edad	**n**	**HPG pre- tratamiento (rango)**	**TRCH (%) (número de animales con valores <90%)**					
			Semana 2	***Semana 3***	***Semana 4***	***Semana 5***	***Semana 6***	***Semana 7***
Yeguas (6 a 17 años)	14	592[a] (230-1.070)	99.9 (0)	100 (0)	100 (0)	98.0 (0)	96.1 (3)[c]	**78.2** (7)
Potrancas (9 a 12 meses)	14	1.404[b] (300 -2.980)	100 (0)	100 (0)	99.8 (0)	92.9 (6)	**82.1** (10)[d]	NC

Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ([a] y [b]: p=0.030; [c] y [d]: p= 0.001). n.c. = no corresponde

Discusión y conclusión. El número de animales en este estudio fue relativamente bajo pero consideramos que nuestros datos y conclusiones son relevantes debido a las similaridad de biotipo, sexo y antecedentes comunes de los animales experimentales. En este contexto, todas las potrancas fueron nacidas en el mismo establecimiento donde las madres fueron preñadas, mantuvieron su gestación y de igual forma fueron expuestas e infectadas con parásitos intestinales a partir de las mismas pasturas sobre las que pastorearon. A conocimiento de los autores, este sería el primer estudio sobre el PRH en animales jóvenes *vs* adultos tratados con ivermectina que considera estas variables y que se realiza en un mismo establecimiento. El PRH es utilizado como una herramienta o indicador temprano de la resistencia a los antihelmínticos pero no existe actualmente un protocolo o estandarización de este test *in vivo*. Mientras esta información no esté disponible, un cuidado especial debería darse a la homogeneidad en la edad de los animales involucrados en determinaciones del PRH a fines de evitar asunciones que pueden resultar incorrectas.

Bibliografía

-Anziani & Ardusso. 2017. Resistencia a los antihelmínticos en nematodes intestinales que parasitan a los equinos en la Argentina. RIA. 43: 24-35.
-Beasley *et* al. 2017. A Survey of Macrocyclic Lactone Efficacy in Australian Cyathostomin Populations. Vet. Parasitol. Regional Studies and Reports. 8: 127-132.
-Nielsen MK *et al*. 2016. AAEP Parasite Control Guidelines. Online at www.aaep.org on 3/24/2018 American Association of Equine Practitioners.
-Geurden T *et al*. 2014. Decreased strongyle egg re-appearance period after treatment with ivermectin and moxidectin in horses in Belgium, Italy and The Netherlands. Vet Parasitol 204: 291-296.

P12- MIGRACIÓN DE ADULTOS DE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* ENTRE BOVINOS EN POTREROS CON DIFERENTE CARGA ANIMAL. RESULTADOS PRELIMINARES

M. Mazzucco Panizza[1], MV. Rossner[2], M. Signorini[3], S. Nava[1,3]
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Estaciones Experimentales Agropecuarias Rafaela[1] y Colonia Benítez[2], CONICET[3]
e-mail: mazzuccopanizza.m@inta.gob.ar

Introducción

La garrapata común del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, pertenece a un subgénero que cumple la totalidad de su fase parasítica sobre un mismo animal[1]. Sin embargo, algunos investigadores reportan la migración de especímenes de *R. microplus* entre bovinos[2,3,4]. La migración de garrapatas adultas entre hospedadores se ha demostrado para varias especies de la familia Ixodidae. Este evento podría ser determinante en la transmisión intraestadial de bacterias patógenas como *Anaplasma marginale*.

La información sobre los factores que afectan la dinámica de migración de *R. microplus* es escasa y se ha hipotetizado que una de las principales causas asociadas a la misma, sería la carga animal. El objetivo de éste trabajo fue determinar la influencia de la carga animal en la migración de adultos (machos y hembras) de *R. microplus* entre bovinos.

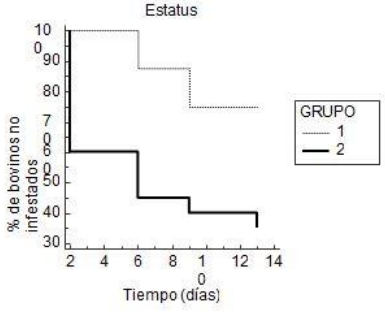
Materiales y métodos

Dos grupos de animales (vaquillas de raza Braford de ~ 300 kpv) se distribuyeron en sendos potreros con una carga de dos y cinco animales por hectárea cada uno. El Grupo 1 (G1) se constituyó con dos bovinos infestados ("dadores") y ocho bovinos no infestados ("receptores") y el G2 con cinco bovinos infestados y veinte no infestados. En ambos grupos la prevalencia de infestación (bovinos parasitados/total bovinos) fue del 20%. Los bovinos destinados a ser "receptores" fueron tratados 17 días antes del día 0 con flumetrina (Bayticol *pour on*) y 48 h antes con fipronil (Ectoline). El día 0 fueron revisados exhaustivamente para verificar ausencia de garrapatas. Los bovinos dadores ingresaron al ensayo con una intensidad de infestación (cantidad de garrapatas/bovinos infestados) de 174-306 especímenes adultos (Intervalo de confianza 95%). Se determinó una duración del ensayo de 14 días para evitar el registro de las garrapatas procedentes de la pastura, representadas por larvas y ninfas. Los bovinos receptores fueron examinados los días 2, 6, 9 y 13 posteriores al día en que fueron agrupados con los bovinos infestados y se contabilizaron los estadios de neoginas, partenoginas, teleoginas, neandros y gonandros presentes. La significancia estadística para la incidencia acumulada (IA) se calculó utilizando el test Chi-cuadrado y la velocidad de infestación de ambos grupos se calculó mediante test de supervivencia de Kaplan-Meier (MedCalc).

Resultados

La IA al día 13 fue de un 25% (2/8) para el G1 y un 65% (13/20) para el G2, esta diferencia no resultó significativa (p=0,13). La velocidad de infestación (Fig. 1) fue mayor en el G2 encontrándose una diferencia estadísticamente significativa respecto a la velocidad de infestación del G1 (p= 0,05). De la totalidad de las garrapatas adultas que se registraron en los animales receptores, un 35% eran machos y un 65% hembras.

Figura 1: Porcentaje de bovinos no infestados a lo largo del tiempo.



Discusión y conclusiones

Los resultados coinciden con hallazgos previos[2,3,4] que reportan el pasaje de garrapatas entre bovinos en condiciones experimentales. Sobre migración en condiciones naturales, Guglielmone y Mangold (comunicación personal) señalaron la transferencia de una hembra de *R. microplus* (IA 16,6%) en un período de seis días en un grupo de animales con prevalencia inicial de infestación del 65%. Este no es un dato despreciable considerando la baja carga animal del potrero (1 animal/ha). En el presente trabajo se obtuvo una IA similar (12,5%), en el grupo de menor carga animal (2 animales/ha) en el día 6. El registro de garrapatas tanto machos como hembras en bovinos inicialmente no infestados, concuerda con estudios previos[2,3,4].

La transferencia de garrapatas entre hospedadores adquiere especial relevancia en la epidemiología de transmisión de patógenos. Respecto a *R. microplus*, se demostró que es capaz de transmitir *A. marginale* con una cantidad tan baja como tres adultos infectados a partir de ninfas alimentadas en un ternero con 0,3% de rickettsemia (frotis sanguíneo)[5]. La importancia de este fenómeno en la transmisión de *A. marginale* es cuestionada dado que en teoría *R. microplus* completa la totalidad de su ciclo parasítico sobre el mismo hospedador. Bajo esta premisa, la única forma posible de transmisión de patógenos sería la transovárica, y no existen hasta el momento evidencias contundentes de lo mencionado. Las observaciones de pasaje de especímenes adultos orientan a suponer que la oportunidad de infectar con *A. marginale* a un bovino susceptible a partir de uno infectado, se generaría mediante transmisión intraestadial. Estudios anteriores reportan infección con *A. marginale* y presencia de ejemplares de *R. microplus* en bovinos susceptibles alojados con bovinos infestados e infectados experimentalmente con el patógeno. La interpretación de estos datos debe estar sujeta a detalles no menores como la posible intervención de otros vectores mecánicos de *A. marginale* (dípteros hematófagos) y la sensibilidad de las pruebas utilizadas para asegurar la negatividad de los bovinos susceptibles al inicio de la experiencia.

Los resultados del presente trabajo no sólo demuestran que ocurre transferencia de adultos de *R. microplus* entre hospedadores, sino que la carga animal afecta a la velocidad de trasferencia. Es necesario repetir el ensayo para revalidar la hipótesis planteada. Futuros estudios cuantitativos sobre la migración de *R. microplus* y sus factores determinantes, permitirán revelar la influencia de este fenómeno en la epidemiología de la anaplasmosis bovina.

Bibliografía

- Nava, S., Venzal, J.M., González-Acuña, D., Martins, T.F., & Guglielmone, A.A., 2017. Ticks of the southern cone of America. Williams, H., (Ed.). p. 348). USA. Elsevier Sci. Publishing Co Inc.
- Connell, M.L., & Hall, W.T., 1972. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. Aust. Vet. J. 48, 477.
- Mason, C.A., & Norval, R.A.I., 1981. The transfer of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) from infested to uninfested cattle under field conditions. Vet. Parasitol. 8, 185–188.
- Uilenberg, G., 1968. Notes sur les babesioses et l'anaplasmose des bovins à Madagascar. I. Introduction. Transmission. Revue Elev. Med. Vet. Pays. Trop. 23: 309.
- Aguirre, D.H., Gaido, A.B., Viñabal, A.E., Echaide, S.T. de, y Guglielmone, A.A., 1994. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. Parasite. 1, 405–407.

P13- IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *TRICHINELLA* PROVENIENTES DEL SUDOESTE BONAERENSE

I. Alvarez[1*], C. Quartucci[1], E. Schmale[1], L.González[1], E. Riva[2], P. Steffan[2], G.Gatti[3] S.Krivokapich[3]
[1] Laboratorio ALVAREZ, Bahía Blanca [2] Área de Parasitología FCV-UNICEN [3] Departamento de Parasitología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, ‘‘Dr. Carlos G. Malbrán’*ignacio@labalvarez.com.ar

Introducción

Trichinella spp. es un parásito helminto que puede infectar a una gran variedad de mamíferos, produciendo una enfermedad conocida como trichinellosis. La principal fuente de infección en humanos es la carne de cerdo doméstico. Sin embargo, en los últimos años se han detectado animales silvestres infectados con *T. spiralis*, que también pueden actuar como fuentes de infección para el hombre debido al consumo de su carne. En 2012 se identificó *T. britovi* en un brote humano en Mendoza y en 2014 se aisló *T. pseudoespiralis* de un cerdo doméstico de la provincia de Río Negro, convirtiéndose en el primer hallazgo en la Argentina de esta especie no encapsulada. Estas especies, como también *T. spiralis* se consideran introducidas, no obstante, existe una especie autóctona (*T. patagoniensis*) hallada en pumas que se encuentra ampliamente distribuida en Argentina. La presencia de especies diferentes a *T. spiralis* en nuestro país hace suponer que podrían estar involucradas en algunos casos reportados en humanos.

El objetivo de este trabajo es dar a conocer datos epidemiológicos recabados durante 2017 por el Laboratorio Álvarez e identificar a nivel de especie los aislamientos de *Trichinella* hallados en las muestras remitidas por productores del sudoeste bonaerense y frigoríficos del área de influencia de dicho laboratorio.

Materiales y métodos

Durante el año 2017 se procesaron en el Laboratorio Alvarez 12.402 muestras de carne de cerdos domésticos y animales silvestres, como así también embutidos o salazones. Dicho laboratorio cuenta con certificación oficial (SENASA) como laboratorio en red para el diagnóstico de este agente.
El 89,1% de las muestras analizadas provino de frigoríficos habilitados ubicados en el sudoeste de la provincia Buenos Aires, mientras que el restante 10,9% proviene de la cría de cerdos en traspatio y la caza deportiva.

Las muestras (músculos diafragmáticos, intercostales, lengua, maseteros, embutidos y/o salazones) fueron procesadas mediante la técnica oficial de digestión artificial (DA) (Resolución 740/99 SENASA; Disposición 439/99 MAA). Aquellas en las que se hallaron larvas L1 de *Trichinella* se enviaron al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán”, donde se efectuó la identificación molecular de especies con la la técnica de PCR Multiplex de regiones variables de ADN ribosomal descripta por Zarlenga et al (1999).

Resultados

Del total de las muestras procesadas, 7 resultaron positivas; 2 pertenecientes a ejemplares de jabalí (*Sus scrofa*) y 5 a cerdos domésticos (*Sus scrofa domestica*) criados en traspatio o en pequeña escala.
Tres de las muestras positivas pertenecían a la localidad de Tornquist, dos a Bahía Blanca, una a Villarino y una a Tres Arroyos. Cuatro de las 7 muestras provenían de la cría de cerdo en traspatio o en pequeña escala de cerdo; 2 de la caza deportiva y 1 muestra derivada de frigorífico.

Por la técnica de PCR se pudo identificar la especie *T.spiralis* en 3 casos. En el resto de los aislamientos no fue posible identificar la especie (Tabla1).

Hospedador	Localidad	Larvas/gr (DA)	Identificación molecular
Cerdo (*sus scrofa* domestica)	Tornquist	15	*T.spiralis*
Jabalí (*sus scrofa*)	Bahía Blanca	35	*T.spiralis*
Cerdo (*sus scrofa* domestica)	Bahía Blanca	5	*Trichinella spp.*
Cerdo (*sus scrofa* domestica)	Tornquist	28	*Trichinella spp.*
Cerdo (*sus scrofa* domestica)	Villalonga	16	*Trichinella spp.*
Jabalí (*sus scrofa*)	Tornquist	2	*T.spiralis*
Cerdo (*sus scrofa* domestica)	Tres arroyos	3	*Trichinella spp.*

Tabla 1: Resultados de la DA y la identificación molecular de las especies de Trichinella.

Discusión y conclusión

Los resultados obtenidos demuestran que hay mayor probabilidad de obtener una muestra positiva cuando proviene de la crianza traspatio o la caza en comparación a las enviadas por frigoríficos, Esto podría ser atribuido a las mejores condiciones higiénico-sanitarias de los animales enviados a faena oficial.
La prevalencia observada en el jabalí demuestra la importancia de los animales silvestres como fuentes de infección para el hombre. Más aun teniendo en cuenta el incremento considerable en la población de esta especie animal en la región sudoeste de la provincia de Buenos Aires, lo que conduce a un aumento de su caza. Esto resalta la importancia de concientizar a la población sobre el riesgo que implica la crianza de cerdos sin las medidas higiénico-sanitarias adecuadas. Como así también, el consumo de carne o derivados porcinos que no hayan sido sometidos a control veterinario específico en busca de larvas de *Trichinella* spp. La expresión sintomática de la infección en el hombre se produce al consumir un mínimo de 70 a 150 larvas por lo que la cantidad de larvas recuperadas por gramo de músculo en cerdos y jabalíes son suficientes para producir trichinellosis con curso clínico de diversa intensidad.
La identificación molecular muestra que 3 de los 7 aislamientos de *Trichinella* analizados pertenecían a *T. spiralis*. Esta especie de *Trichinella* es altamente patógena y es responsable de la mayoría de las infecciones humanas, sin embargo el estudio de fauna silvestre con resultados positivos a *T. spiralis* y *T. patagoniensis* sustentan la necesidad de incrementar las investigaciones, más aun siendo imposible la diferenciación de la especie por su morfología.
Estos hallazgos agregan nuevos datos sobre la epidemiología de la triquinosis y deben considerarse al implementar nuevas estrategias para el control de esta zoonosis.

Bibliografía. Pasqualetti et al. 2014. Rev Med Vet 95(2):12 - 21
Villamil et al 2013. RAZyEIE 8(2): 16-19
Krivokapich et al. 2012. International Journal for Parasitology 42: 903-910
Krivokapich et al. 2006. Journal of Helminthology 80: 267–269
First finding of *Trichinella pseudospiralis* in the Neotropical region Krivokapich S, Gonzalez Prous C L, Gatti G M, Saldia L. Veterinary Parasitology, (2015), 208:268-71

P14- EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE *TRITRICHOMONA FOETUS*

J.A García[1], R Malena[2], F. Paolicchi[2].
[1] Becario CONICET, [2]Laboratorio de Bacteriología, INTA, Balcarce, Buenos Aires, Argentina.
*garcia.juanagustin@inta.gob.ar

Introducción

Tritrichomona foetus (Tf) es un protozoo extracelular flagelado móvil que habita el prepucio de los toros y causa la tricomonosis, una enfermedad de transmisión sexual asociada a bajos porcentajes de preñez. El diagnóstico de rutina se basa en la observación directa en microscopio del agente causal a partir de secreciones genitales, tejidos y líquidos fetales abortados. Para ello es necesario la utilización de medios de cultivos adecuados que permitan el desarrollo del protozoo para su observación. En el presente trabajo se evaluaron 3 medios de cultivos con el fin de determinar su calidad para el diagnóstico de *T. foetus*.

Materiales y métodos

Se utilizaron los siguientes 3 medios de cultivo: base de Diamond con agar al 1,3% (D), base Plastridge con agar 0,8% (P 0,8) y base Plastridge con agar al 1,4% (P 1,4). A todos los medios se les agregó suero equino inactivado al 10%, antibióticos (penicilina, 10.000 unidades/ml y estreptomicina, 10.000 µg/ml) y antimicótico (anfotericina 25 µg/ml) al 1%. Los medios fueron fraccionados en un volumen de 4ml por tubo de vidrio con tapón a rosca. Se agregó un inóculo inicial de una cepa de *T. foetus* con una concentración inicial de 25.000 Tf/ml, en 6 tubos para cada medio de cultivo. Se utilizó un tubo por medio de cultivo por cada 24h de observación por 6 días (24, 48, 72, 96, 120, 144). De cada tubo se extrajo una alícuota y se diluyó en solución fisiológica formolada al 1%, para determinar concentración del protozoo tras recuento directo en cámara de Neubauer (Tf/ml). Las diluciones utilizadas fueron de 1/10 a 1/50 según densidad de crecimiento por observación directa de gota al microscopio. Se evaluó dinámica de curva de crecimiento por el período de 6 días (144h). La determinación de pH en cada día se realizó mediante tiras reactivas (rango entre 4 y 10).

Resultados

Los valores de concentración del protozoo, factor de multiplicación y pH en los medios de cultivo durante los 6 días se detallan en la Tabla 1. En cada día de observación el pH se mantuvo igual en cada uno de los medios, pero con valores descendentes hacia el último día de observación.

Tabla 1. Concentración y factor de multiplicación de *Tritrichomona foetus* por ml, y pH de los 3 medios de cultivos cada 24h por 6 días

Medio	0h	24h (Fm)	48h (Fm)	72h(Fm)	96h (Fm)	120h (Fm)	144h (Fm)
D	25000	650000 (x26)	11350000 (x17,5)	9750000 (x0,9)	3750000 (x0,4)	125000 (x0,03)	0 (x0)
P 1,4	25000	250000 (x10)	2500000 (x10)	8950000 (x3,6)	5100000 (x0,6)	2500000 (x0,5)	975000 (x0,4)
P 0,8	25000	175000 (x7)	1325000 (x7,6)	7050000 (x5,3)	5250000 (x0,7)	3250000 (x0,6)	850000 (x0,3)
pH	7	6,5	6	5,5	5	4,5	4,5

***D= Diamond; P= Plastridge*; Fm= factor de multiplicación.**

Discusión y conclusión

Todos los medios presentaron una muy buena curva de crecimiento con un pH inicial adecuado para el desarrollo del protozoo. El medio de base Diamond presentó un crecimiento exponencial entre las 24 y 48h, lo que permite un diagnóstico temprano-rápido. A diferencia de los medios de base Plastridge, los cuales presentaron el pico de crecimiento a las 72h con una fase estacionaria y de muerte celular más tardía. Esto sugiere que el diagnóstico de tricomonosis debería lograrse dentro de las 72h. A partir de las 72h, principalmente en el medio Diamond, se observaron gran cantidad de formas pseudoquísticas del protozoo. Esto determina que vayan agotándose los nutrientes, siendo un medio explosivo de rápido crecimiento pero que a partir de las 96h la muerte celular es rápida. Es necesario realizar la evaluación de los medios de cultivo con el uso cepas conocidas,cada vez que se elabora una partida con el fin de obtener un producto de calidad y confiable. Esto permite concluir que ambos medios permiten un adecuado diagnóstico de tricomonosis.

Bibliografía

-Campero CM et al. 1993. Evaluación de medios de cultivo para *Tritrichomonas foetus* utilizados en laboratorios de diagnóstico veterinario de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev. Med. Arg, 74(2).
-Campero CM et al. 2017. Tricomonosis bovina. En: Abortos y otras pérdidas reproductivas en bovinos: diagnóstico y control, 1ra ed, Hemisferio Sur SA, Buenos Aires, Argentina, p.141:147.
Michi AN et al. 2016. A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. Theriogenology, 85(5).

P15- DETECCIÓN DE *ASCARIS LUMBRICOIDES* EN *ALOUATTA CARAYA* RESIDENTES EN LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE CORRIENTES Y SU POTENCIAL ACCIÓN ZOONÓTICA

T. Rigonatto[1]; M.A. Oviedo[1]; G.V. Laffont[1]; A. Grossi[1]; S. Costaguta[1]
[1]Cátedra de Zoología y Ecología, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste
teresitarigonatto@hotmail.com.ar

Introducción

Entre los primates no humanos, *Alouatta caraya* (mono aullador) presenta una amplia distribución geográfica, extendiéndose desde México hasta el sur de Brasil y Noreste de Argentina. En nuestro país está presente en las provincias de Misiones, Corrientes, Chaco, Formosa y Santa Fe. Esta especie es una de las pocas con dicromatismo sexual manifiesto, presentando las hembras y juveniles de ambos sexos una coloración pardo amarillenta, mientras que los machos a partir de la madurez sexual son de color negro. En cuanto a su estructura social, se conforma de tropas con un macho dominante, algunos juveniles y un número variable de hembras. Son animales exclusivamente arborícolas, con una alimentación basada en hojas y frutos. Están incluidos actualmente en el Apéndice II de la CITES (Comercio Internacional Regulado y Restringido), debido a varios factores antrópicos como la transformación de su hábitat, el efecto simultáneo de la deforestación y los brotes de fiebre amarilla (SAREM 2012), todas las especies de primates han mantenido o aumentado su riesgo de extinción. Asimismo, la captura indiscriminada para su tenencia como mascotas o la caza por considerarlos perjudiciales a los cultivos, podría causar una mayor disminución poblacional, con un potencial impacto negativo sobre el ecosistema, dado su importante función como diseminador ecológico, para la regeneración de la selva. Sin dejar de mencionar el papel que cumple como reservorio, centinela y transmisor de diferentes zoonosis. Las geohelmintiasis son endémicas en los países en desarrollo y constituyen un indicador de las condiciones sanitarias y ecológicas del entorno de sus hospedadores. Teniendo en cuenta que esta parasitosis puede afectar a más del 50% de la población pediátrica en áreas húmedas, se puede estimar que en nuestro país existirían aproximadamente 3.000.000 de niños parasitados con *Ascaris lumbricoides*. La Organización Mundial de la Salud indica que más de 609 millones de niños en edad escolar del mundo necesitan de tratamiento preventivo para las helmintiasis transmitidas por el suelo, estimándose una mortalidad de 20.000 casos anuales. Es importante mencionar que entre una de las parasitosis reportadas en esta especie se encuentra la ascariosis causada por *Ascaris lumbricoides*, geohelminto cosmopolita ampliamente diseminado en todo el mundo. Las hembras, cuya extremidad posterior es cónica, miden 20-30 cm de largo por 4-6 mm de ancho, y los machos, 15-20 cm por 2-4 mm y tienen la cola enroscada. Una hembra adulta puede depositar hasta 200.000 huevos diariamente. El contagio se produce por la ingestión de huevos embrionados; las larvas en el duodeno penetran la mucosa intestinal, migran y llegan al lecho vascular pulmonar, donde perforan el endotelio alveolar y llegan a las vías aéreas superiores. De allí, se dirigen a la faringe, donde son nuevamente ingeridas. Cuando retornan al tracto gastrointestinal superior, las larvas ya son adultas. Este ciclo se completa en 2-3 meses. La importancia zoonótica - sanitaria de los monos aulladores en el noreste de Argentina, puede relacionarse con su distribución, asociada a los grandes efluentes como el Río Paraná, que favorecen la colonización y dispersión de parásitos, incrementando los riesgos sanitarios para el hombre no solo por la frecuencia con que estos primates entran en contacto con él o sus instalaciones, sino también por ser ésta una zona donde habitan vectores involucrados en la transmisión de enfermedades.

Materiales y métodos

El presente estudio fue realizado en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste, ubicada en la ciudad de Corrientes, donde habita una colonia de *A. caraya*, conformada por 1 macho adulto, 2 juveniles y 6 hembras de diferentes edades cuyo estatus sanitario se desconoce. Con el objeto de establecer la presencia de parásitos gastrointestinales, se procedió a la recolección de muestras de materia fecal fresca en sectores con intensa circulación. Estas fueron obtenidas entre los meses de marzo a julio de 2018 y durante el tiempo de muestreo no se implementó ningún tratamiento antiparasitario. Las muestras fueron recolectadas cada siete días en forma de pool, en recipientes plásticos rotulados. Las mismas fueron procesadas en el lapso no mayor a 24 horas, mediante una técnica de flotación con solución sobresaturada de cloruro de sodio por el método de Willis, observadas por medio de microscopía óptica con objetivos 40X y 100X, en el Laboratorio de Diagnóstico dependiente de la Cátedra de Zoología y Ecología.

Resultados

En total se procesaron 21 pool de materia fecal, en las que se identificaron huevos de *A. lumbricoides* (++) y ooquistes de coccidios (+). Los análisis coproparasitológicos evidenciaron una moderada carga parasitaria de *A. lumbricoides*, de 1 a 10 huevos x campos examinados: (++) (Thienpont *et al,* 1986).

Discusión y conclusión

Los primates son particularmente vulnerables a las infecciones por parásitos de transmisión directa debido a que usualmente éstos viven en grupos sociales que facilitan su transmisión (Milozzi, 2012). Los resultados de nuestro estudio pueden contribuir al conocimiento básico de los parásitos intestinales que afectan a los monos aulladores. Los estudios coprológicos de endoparásitos nos permitirán estimar de forma no invasiva la salud de los individuos, detectar la presencia de parásitos de importancia zoonótica y evaluar si existe algún riesgo para otras poblaciones silvestres en caso de translocación. Los monos (*Alouatta caraya*) pueden actuar como centinelas efectivos para la salud general del ecosistema y alertarnos sobre epidemias inminentes en la población humana Kowalewski (2010).

Bibliografia

- Kowalewski, Martín M.; Salzer, Johanna S.; Deutsch, Joseph C.; Raño, Mariana; Kuhlenschmidt, Mark S.; Gillespie Thomas R.Patterns of zoonotic protozoa infection in black and gold howler monkeys (Alouatta caraya) relative to degree of human-primate contact. American Journal of Primatology; Año: 2010 vol. 71 p. 1 - 9
- Milozzi, Carola; Bruno, Gabriela; Cundom, Elisa; Mudry, Marta; Graciela T. Navone. 2012. Intestinal parasites of Alouatta caraya (Primates, Ceboidea): preliminary study in semi-captivity and in the wild in Argentina. Mastozool. neotrop. Vol.19:2.
- Santa Cruz, A. C. M.; Borda, J. T.; Patiño, E. M.; Gómez, L.; Zunino, M. 2000. Habitat fragmentation and parasitism in howler monkeys (Alouatta caraya). Neotropical Primates 8:146-148
- Thienpont D.; Rochette F; Vanparijs O. F. 1986. Diagnóstico de las Helmintiasis por Medio de Examen Coprológico. Ed. Jassen Research, Fuundation Beerse Bélgica. Pag. 30 y 111.

P16- DIAGNÓSTICO DIRECTO DE TRICHINELLOSIS PORCINA: CALIDAD DEL PROCEDIMIENTO A TRAVÉS DE MUESTRAS DE PROFICIENCIA

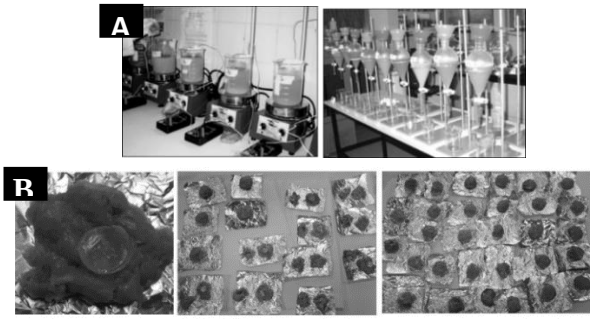
M.T. Ruarte[1,2]; G. E. Morici[1]; J.H. Schapiro[1] y M. G. Dominguez[1]
1. Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
2. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica.
dominguez.mariana@inta.gob.ar

Introducción

La triquinosis en Argentina es una zoonosis endémica causada por el nematodo del género *Trichinella* spp. por el consumo de carne infectada cruda o mal cocida (Capo and Despommier, 1996).
En el período 2015 a 2016 se notificaron 1998 y confirmaron 704 casos clínicos humanos a nivel nacional según consta en el Boletín Integrado de Vigilancia del Ministerio de Salud de la Nación (N° 346 - SE 5 - febrero 2017).
Los laboratorios que diagnostican Trichinellosis por el método de Digestión Artificial Rápida (DAR), deben mantener un adecuado sistema de calidad para garantizar la sensibilidad del ensayo, siendo monitoreada periódicamente su eficacia utilizando paneles de muestras en ensayos ciegos (pruebas de proficiencia) (Gajadhar & Forbes, 2001).
Este trabajo tuvo como objetivo establecer las mejores condiciones en la preparación y conservación de muestras para su utilización en un panel de proficiencia entre diferentes laboratorios que practican esta técnica.

Materiales y métodos

Se elaboraron 33 muestras de 20 gramos de carne conteniendo 15+/- 2 larvas libres/enquistadas de *T. spiralis* cada una, para ser analizadas por la técnica DAR (Foto A), por triplicado, cada 3 días durante 15 días, conservadas en bolsas plásticas bajo 2 condiciones diferentes de temperatura: -18.5 °C y 4 °C +/- 1°C.
Para facilitar la inserción de las larvas en las esferas de carne, las mismas fueron insertas en matrices de agar al 1 % de 1.5 cm de diámetro por 0,3 cm de espesor. (Foto B).



Fotos: Técnica DAR para la obtención de larvas de *Trichinella* (A). Preparación de muestras a testear (B).

Resultados

No se logró obtener la totalidad de larvas en las bolas de carne, bajo las condiciones ensayadas.
El porcentaje de recuperación de larvas fue mayor al 60% en la totalidad de las muestras conservadas a 4°C en el tiempo evaluado, siendo los días 6 y 9 los que mostraron menor porcentaje de recuperación y mayor dispersión de los valores. (Figura 2).
Respecto a las muestras conservadas a -18°C el máximo porcentaje de recuperación obtenido fue del 57.58%, y con valores de dispersión entre las muestras superiores a las mantenidas a 4 °C en todos los tiempos.
La tendencia a disminuir el porcentaje de recuperación a través del tiempo se ve claramente marcada a -18°C respecto a 4°C.

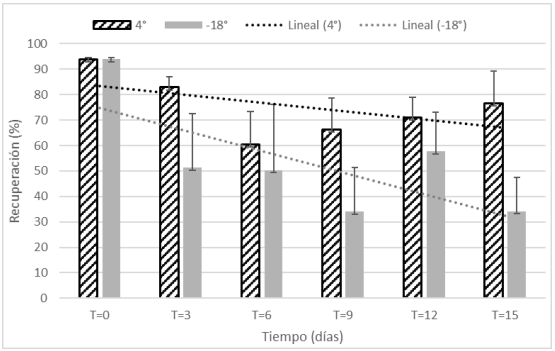


Figura 1: Recuperación de larvas de *T. spiralis* en los diferentes tiempos y condiciones de conservación.

Discusión

Se deben realizar más pruebas conducentes a la obtención de larvas enquistadas para ser utilizadas en las muestras a testear, variando el tiempo de incubación y la concentración de pepsina y ácido clorhídrico.
Se observó que las matrices de agar no se disolvían completamente luego de la DAR, esto podría influir en la disminución del % de recuperación de larvas, incluso en el tiempo 0. Por lo tanto, se deben evaluar otros materiales y porcentajes para la construcción de las matrices donde se inmovilizan las larvas, como así también otras formas de envasado para el envío de las muestras que evite la descomposición de las mismas.

Bibliografía

- Capo V, Despommier DD. (1996). Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. Clin Microbiol Rev. 9(1), 7–54.
- Gajadhar A.A. & Forbes L.B. (2001). An internationally recognized quality assurance system for diagnostic parasitology in animal health and food safety with example data on trichinellosis. Vet. Parasitol., 103, 133-140.

P17- CARACTERIZACION *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD DE IVERMECTINA SOBRE *HAEMONCHUS CONTORTUS*

M. Lloberas[1], S. Luque[2], P. Cardozo[3], C. Entrocasso[†], G. Virkel, [2], L. Alvarez[2], L. Sicalo Gianechini[4], A. Lifschitz[2,]
1 Laboratorio de Parasitologia, EEA INTA Balcarce, 2 Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN) (UNCPBA-CICPBA-CONICET), 3 EEA Catamarca., 4 Actividad privada. APC: leosicalo@gmail.com

Introducción

El control de las parasitosis gastrointestinales es fundamental en la producción ganadera, Sin embargo, el desarrollo de la resistencia a los antihelmínticos amenaza la sustentabilidad de diferentes producciones. La evaluación de la eficacia y potencial resistencia de los nematodos gastrointestinales se basa principalmente en técnicas *in vivo* como el Test de Reducción del Conteo de Huevos (TRCH) y el Test de Eficacia Controlada (TEC) (Coles *et al.* 1992; Wood *et al.* 1995). Estas técnicas presentan buena sensibilidad cuando el porcentaje de resistencia antihelmíntica (RA) de la población de parásitos es mayor al 25 % (Martin *et al.* 1989). En los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas de diagnóstico de resistencia *in vitro*, dentro de ellas el Test de inhibición de la motilidad larval (TIML). Dichas técnicas presentan mayor sensibilidad que las técnicas *in vivo* y se propusieron como una herramienta útil para el diagnóstico temprano de resistencia. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar mediante el TIML la actividad *in vitro* de ivermectina (IVM) contra aislamientos de campo de *Haemonchus contortus* resistentes y susceptibles.

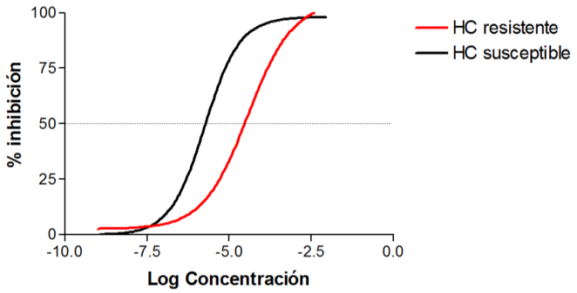
Materiales y métodos

La técnica fue una modificación a la originalmente descripta por Demeler *et al.* (2010). Se utilizaron soluciones madre a partir del producto comercial de referencia. Las concentraciones finales de IVM fueron desde 5 ng/ml a 550 ng/ml, rango que comprende a los hallados en plasma, contenido abomasal y *H. contortus* adultos luego del tratamiento con IVM en ovinos (0,2 mg/Kg) (Lloberas *et al*. 2012). Las L3 se obtuvieron a partir de animales infestados experimentalmente con un aislamiento de *H. contortus* resistente (R8) y otro de *H. contortus* susceptible (CEDIVE). Se evaluaron ocho concentraciones de droga, con 6 repeticiones por concentración en cada placa y por duplicado. A su vez se realizaron 4 pruebas completas para cada aislamiento. Se calculó el porcentaje de inhibición de la migración según la fórmula: % de inhibición: (Número de larvas no migradas/Número total de larvas) * 100. Los datos se ajustaron a una curva dosis respuesta mediante una regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism. Se calculó la dosis inhibitoria 50 (DI50), la dosis inhibitoria 90 (DI90) y el intervalo de confianza al 95 % (IC 95 %), para cada aislamiento y el factor de resistencia (FR) (promedio de la DI50 de la cepa resistente/ promedio de la DI50 para la cepa susceptible).

Resultados

Para cada aislamiento se obtuvo una curva dosis-respuesta con una bondad de ajuste entre 90 y 97 % (figura 1). El coeficiente de variación fue menor a 20%. Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la respuesta a la dosis de IVM entre las poblaciones susceptibles y resistentes. Los parámetros obtenidos del análisis de las curvas dosis respuesta se muestran en el cuadro 1. El FR fue de 20,6. La comparación de las DI50 y DI90 de HC resistente versus DI50 y DI90 de HC susceptible arrojó diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Figura 1: Actividad de la IVM expresada como porcentaje de inhibición de la migración larval en aislamientos de *H. contortus* (HC) provenientes de poblaciones susceptibles versus resistentes (concentraciones en M). Cada curva representa el promedio de 4 repeticiones de pruebas completas (n= 24).



Cuadro 1: Parámetros obtenidos de las curvas dosis-respuesta. DI50: dosis inhibitoria 50; DI90: dosis inhibitoria 90

Aislamiento	DI50	DI90	ES	r^2
***H. contortus* Resistente**	$3,73*10^{-5}$ * (32,6 µg/ml)	$1,17*10^{-3}$ * (1023,7 g/ml)	0,13	0,94
***H. contortus* Susceptible**	$1,81*10^{-6}$ * (1,57 g/ml)	$2,61*10^{-5}$ * (22,84 µg/ml)	0,08	0,95

ES: error standard; r2: porcentaje de determinación. * diferencia estadística ($p \leq 0,05$).

Discusión

El valor obtenido para la DI50 del aislamiento resistente mostró valores comparables a los obtenidos por Demeler *et al.* (2010). Las curvas dosis- respuesta (r = 94 y 95 %) y la DI50 para IVM tuvieron una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre el aislamiento susceptible y resistente. Se observó que la diferencia es más marcada cuando se comparan la DI 90, demostrando que a valores de inhibición cercanos a los utilizados con los test in vivo, la diferencia entre aislamientos es más notoria El factor de resistencia fue significativamente mayor (FR: 20,1) a los obtenidos por otros autores.

Conclusiones

El TIML resulto ser una prueba eficaz para establecer diferencias entre aislamientos susceptibles y resistentes. Sin embargo, existe un importante número de factores que influyen en los resultados de la prueba y se observa una dificultad en reproducir los mismos. En este contexto resulta difícil que con los avances actuales esta técnica sea utilizada para reemplazar el TRCH que se realiza *in vivo* para diagnosticar la resistencia antiparasitaria.

Bibliografía

-Coles GC, *et al.* 1992. Vet Parasitol. Sep; 44 (1-2):35-44
-Wood IB, *et al.* 1995. Vet Parasitol, 58 (3):181-213
-Martin PJ, *et al.* 1989. Aus. Vet. J.66, 236-240.
-Demeler J *et al.* 2010. Vet. Parasitol. 2010; 170: 61–70
-Lloberas, M *et al.* 2012 Exp. Parasitol. 131,3: 304-309.

P18- TINCIÓN DE HUEVOS EN MATERIA FECAL COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA LA HAEMONCHOSIS OVINA

L. Sicalo Gianechini[1], S. Luque[2], P. Cardozo[3], M. Lloberas[4].
1. Actividad privada. 2. CIVETAN(UNCPBA-CICPBA_CONICET). 3. EEA INTA Catamarca. 4. Laboratorio de Parasitología EEA INTA Balcarce. Autor por correspondencia: leosicalo@gmail.com

Introducción

La haemonchosis, es una de las enfermedades parasitarias que produce mayores pérdidas en la producción ovina a nivel mundial. Sus efectos varían desde disminución de la ganancia de peso, afección del vellón en calidad y cantidad, y altos porcentajes de mortandad si no es controlada a tiempo. El diagnóstico de laboratorio de esta parasitosis recae en el conteo de huevos por gramo (hpg) y posterior cultivo de la materia fecal a 22-24°C, lo que tiene una duración mínima de 10 a 15 días para identificar los géneros actuantes. Sumado a la necesidad de contar con personal entrenado para la identificación morfológica de los distintos géneros, y a los diversos factores externos que pueden resultar en el desarrollo diferencial y supervivencia de los mismos. A fin de evitar dichas pérdidas, se torna necesario el diagnóstico rápido y eficiente en las majadas y así efectuar los tratamientos necesarios. En los últimos años, se han desarrollado otros métodos de rápida ejecución, que permiten apoyar el diagnóstico a campo, mediante la utilización de lectinas (en este caso aglutinina de maní) marcadas con fluoresceína que se unen específicamente a ciertos carbohidratos presentes en la cubierta de los huevos de parásitos gastrointestinales (Jurasek *et al*, 2010).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la técnica de tinción de huevos de *Haemonchus contortus* en materia fecal como herramienta de diagnóstico rápido para la haemonchosis.

Materiales y Métodos

El trabajo se llevó a cabo en la recría de la Reserva 8 de la EEA INTA Balcarce, siguiendo las normas establecidas por el comité de bienestar animal (CICUAE). Se realizó la toma de muestras de materia fecal para hpg (Roberts and O'Sullivan, 1950), coprocultivo (Henriksen y Korsholm, 1983) y tinción de huevos (Jurasek *et al*, 2010) en un total de 82 corderos diente de leche de distintas razas (Corriedale, Texel, Poll Dorset y Highlander), en cuatro muestreos dentro de la estación de mayor prevalencia de *H. contortus* en provincia de Buenos Aires (21/02/17, 27/04/17, 11/05/17 y el 13/06/17). Las distintas técnicas de laboratorio se efectuaron simultáneamente en el mismo día de toma de muestras. Previo al protocolo de tinción se efectuó la recuperación de huevos de materia fecal según el protocolo de Varady *et al*. (2007). Posteriormente, se incubaron los huevos recuperados con la PNA-FICT L7381 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), (aglutinina de maní) y lectura de las muestras en un microscopio de fluorescencia. Se realizó una correlación de Pearson de los resultados obtenidos utilizando el paquete estadístico Instat 3.0.

Resultados

En la tabla n°1 se resumen los resultados de hpg y porcentajes de *Haemonchus* spp. obtenidos por tinción de huevos y coprocultivo en las 4 fechas de muestreo.

El análisis de los resultados de la tinción de huevos y los coprocultivos mediante el coeficiente de correlación de Pearson, tomó un valor de r=0,8592 (r^2= 0,7383), correspondiendo el p valor a 0,14 (no significativo).

	HPG mínimo	HPG máximo	HPG promedio	Tinción de huevos	Cultivo de larvas
21/02/17	0	2100	257 (n=17)	0,02%	0%
27/04/17	1320	37560	12777 (n=24)	99,5%	98%
11/05/17	620	4000	1871 (n=20)	9,5%	0%
13/06/17	40	1590	507 (n=20)	2%	48%

Tabla n° 1. Resumen de los resultados de hpg (huevos por gramo), (amplitud y promedio), porcentaje de Haemonchus spp en los coprocultivos y en la tinción de huevos, en las 4 fechas evaluadas.

Discusión

Si bien en este trabajo no se encontró correlación estadística y existen diferencias entre los resultados obtenidos de los coprocultivos y la tinción, es necesario efectuar un mayor número de muestreos para poder establecer una correlación confiable. A pesar de ello, al analizar todos los datos en conjunto, los resultados de la tinción presentan la misma tendencia que el hpg, no así con el coprocultivo. Según Jurasek *et al*, (2010), la falta de correlación entre la tinción y el cultivo de larvas puede estar dada por la variabilidad entre los géneros de trichostrongylideos en cuanto a desarrollo y supervivencia de las larvas. En ese sentido, menciona una supervivencia reducida de *Haemonchus spp*. frente *a Cooperia spp*. y *Oesophagostomum spp*. y una mayor frente a *Teladorsagia circumcincta* en cultivos mixtos.

Conclusiones

Para poder establecer tendencias estadísticas entre la tinción de huevos de *Haemonchus spp* y los coprocultivos, es fundamental aumentar el número de repeticiones de las técnicas en forma pareada. La bibliografía internacional y las experiencias del laboratorio demuestran que la técnica es una opción rápida, económica y eficiente como apoyo para el diagnóstico de *Haemonchosis* ovina a campo. En perspectiva, la técnica puede ser extrapolada a otros géneros parasitarios y facilitar el diagnóstico de la composición genérica del hpg.

Bibliografía

-Henriksen, S. y Korsholm, H. 1983. Nord Vet Med. 35:429-430.
Jurasek M. *et al*. 2010. Vet Parasitol 169(1-2): 209-13.
-Robert´s F. y O'Sullivan O. 1950. Austr. J. of Agric. Res. 1(1) 99 – 102.
-Várady, M. *et al*. 2007. Vet. Parasitol. 149: 104-110.

P19- HALLAZGO DE CÁPSULAS OVÍGERAS POR FLOTACIÓN SIMPLE, UN CASO DE DIPILIDIASIS CANINA

M. Fiorimanti[(1)]; A. Cristofolini[(1)]; S. Arsaute[(1)]; P. Silinszky[(1)]; D. Zelaya[(1)];K. Tiranti[(1)], C. Merkis[(1)].
[(1)]Área de Microscopía Electrónica, Dpto. de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. E-mail: mfiorimanti@ayv.unrc.edu.ar

Introducción

La dipilidiasis es una parasitosis intestinal de importancia veterinaria, potencialmente zoonótica, producida por *Dipylidium caninum*, el cual pertenece al Phylum Platyhelminthes, clase Cestoda, familia Dipylidiidae ([1]). En su ciclo de vida incluye como huéspedes definitivos a perros y gatos, y como huéspedes intermediarios a pulgas *Ctenocephalides canis* (perros), *C. felis* (gatos) y *Pulex irritans* (hombre), así como a piojos *Trichodectes canis.* La dipilidiasis generalmente cursa asintomática, el perro o el gato al tragar las pulgas infestadas desarrollan el cestodo adulto en su intestino. Sin embargo, algunos animales infestados pueden presentar prurito anal intenso que los impulsa a arrastrarse friccionando el ano contra el suelo, y también es posible ver las proglótidas de estos parásitos en la zona perianal de los animales o en los lugares donde éstos descansan ([2]). El diagnóstico se realiza mediante la identificación de las proglótidas grávidas expulsadas por el individuo junto con las heces; característicamente éstas tienen forma de granos de arroz con un poro genital a cada lado, dentro se observan las cápsulas ovígeras con 20 a 30 huevos con embrión hexacanto ([3]). En el presente trabajo se describe un caso de dipilidiasis canina diagnosticada por la técnica coprológica de flotación simple.

Materiales y métodos

Este caso se trató de un canino hembra de raza mestiza de aproximadamente dos meses de edad, de nombre “Paquita” y 3 kg de peso vivo (Figura 1). No presentaba plan de desparasitación ni vacunación previo. Sus propietarios manifestaron haber observado la presencia de parásitos en forma de “granos de arroz” en la zona perianal de dicho canino. Al momento de la consulta, el examen clínico reveló un estado general normal, sin presencia de estructuras parasitarias como describían sus dueños, ni signos de diarrea. Por tal motivo es que se procedió a tomar una muestra de materia fecal para el examen coproparasitológico macroscópico a través de la observación directa y luego se realizó el examen microscópico mediante la técnica de flotación simple con solución sobresaturada azucarada de Benbrook. Posteriormente, se efectuó la lectura de los resultados a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania), adquiriendo las imágenes mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio.

Figura 1. Canino hembra de raza mestiza “Paquita”, 3 meses de edad.

Resultados y discusión

El examen macroscópico directo resultó negativo a la presencia de endoparásitos adultos y estructuras parasitarias como proglótidas grávidas de céstodos. Mediante la técnica microscópica de flotación simple se hallaron estructuras compatibles con cápsulas ovígeras que medían en promedio 163 µm de largo por 129 µm de ancho, con una cubierta delgada hialina, las cuales contenían en su interior alrededor de 10 huevos esféricos, con embrión hexacanto (Figura 2). Dichas estructuras se correspondían con cápsulas ovígeras de *Dipylidium caninum*. Si bien este diagnóstico se confirma con la observación macroscópica de las proglótidas grávidas del parásito que se eliminan junto con las heces, en este caso, su confirmación fue posible por el hallazgo de las cápsulas ovígeras detectadas mediante técnica de flotación simple, suceso que generalmente es inusual en el diagnóstico de laboratorio veterinario ([2]). Esta patología no presenta demasiada gravedad y puede tratarse fácilmente con antihelmínticos orales como praziquantel o niclosamida ([3]), aunque necesariamente su tratamiento debe complementarse con la eliminación de los ectoparásitos del animal, procedimento que fue recomendado a sus dueños.

Figura 2. Cápsula ovígera de *Dipylidium caninum* hallada por flotación simple, mediciones relizadas con el software Axiovision Release 4.6.3 (163,18 µm * 128,9 µm), (400 x).

Cabe destacar que la importancia zoonótica de la dipilidiasis implica un potencial problema de salud pública, debido a que los animales domésticos son los principales reservorios de ectoparásitos y éstos se constituyen en posibles transmisores o vectores del agente etiológico causante de la enfermedad para el humano, principalmente en los niños cuyo contacto con las mascotas es más estrecho ([3]). Si bien la dipilidiasis humana no es una parasitosis grave que ponga en riesgo la vida de los pacientes, ésta puede evitarse mediante el control veterinario del animal con diagnóstico previo de laboratorio, para la desparasitación adecuada y periódica de endo y ectoparásitos. La educación en los niños y en la población general es fundamental para prevenir diversas zoonosis.

Conclusión

Ante la sospecha de parasitosis internas en pequeños animales, el diagnóstico coprológico de laboratorio se constituye en una valiosa herramienta para arribar al diagnóstico definitivo, ya que la desparasitación a ciegas del animal estaría ocultando la prevalencia de enfermedades potencialmente zoonóticas. En este caso, fue posible diagnosticar dipilidiasis canina mediante el hallazgo de cápsulas ovígeras por la técnica coprológica de flotación simple.

Bibliografía

-Ambrosio HJ. (2012) Dipilidiosis. En: Parasitología Médica de Becerril. 3ª ed. México: McGraw-Hill;. pp:177-181.
-Devera R, Campos F. (1998). Dipilidiasis humana. *Rev Biomed*, 9:44-45.
- Martínez I, Gutiérrez Q, Ruiz G, Fernández P, Gutiérrez C, Aguilar V, Shea M, Gaona E. (2014). Dipilidiasis: Una zoonosis poco estudiada. *Rev Latinoamer Patol Clin*, 61 (2).

P20- TENIASIS POCO FRECUENTES EN FELINOS DOMÉSTICOS

M.F. Ruiz[1]; P.L. Fuster[1,2], E. Scheichtel[2]; N. Sferco[1]; A. Aghemo[1]; F.O.Aguirre[1]; R. Zimmermann[1]
[1]Laboratorio de Análisis Clínicos. Hospital de Salud Animal (HSA). Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV). Universidad Nacional del Litoral (UNL). [2] Actividad Privada, Clínica de animales de compañía.
mruiz@fcv.unl.edu.ar

Introducción
El tracto digestivo del gato doméstico es anfitrión de muchos agentes patógenos dentro de los cuales, los parásitos como protozoos y helmintos, son los más comunes de encontrar. Estos parásitos, además del impacto directo sobre la propia salud del animal, representan un riesgo para la salud del hombre, ya que varios de ellos son potencialmente zoonóticos. El presente trabajo tiene como objetivo comunicar el hallazgo de cestodos poco usuales en la clínica felina diaria.

Materiales y métodos
Paciente 1: Mayo de 2018, felino, hembra mestiza, 7 meses de edad, alimentada a base de alimento balanceado, de hábitos domiciliarios, oriundo de la localidad de Villa Minetti (Dpto. 9 de Julio, Santa Fe), desparasitado. Motivo de la consulta: heces diarreicas y por la eliminación de segmentos de cestodos en las mismas.
Paciente 2: Julio de 2018, felino, hembra castrada, mestiza, 18 meses de edad, de hábitos domiciliarios pero con gran instinto cazador, perteneciente a la localidad de Esperanza (Dpto. Las Colonias, Santa Fe). Motivo de la consulta: eliminación espontánea y recurrente de proglótides con las heces.
De ambos pacientes se remitió una muestra de materia fecal al Laboratorio de Análisis Clínicos (HSA-FCV-UNL) para el examen coproparasitológico. Las heces se procesaron mediante el método de Teuscher.
Los proglótides recuperados se remitieron en solución fisiológica formolada al 3,5% a la cátedra de Zoología (FCV-UNL) para su identificación.

Resultados
Paciente 1: la observación microscópica de las heces puso en evidencia huevos de forma ovoide, de color marrón claro, con opérculo en uno de sus polos, siendo su tamaño aproximado 68 µm x 40,5 µm. Dichas características son compatibles con los huevos de cestodos representantes de la familia *Diphyllobothriidae* (figura n° 1). Además, se observaron huevos de *Trichuris* spp
Paciente 2: el examen coproparasitológico demostró huevos esféricos de cáscara gruesa radiada, sin cámara de aire, con el embrión hexacanto en su interior, cuyos tamaños oscilaban entre 30 a 35 µm de diámetro. Esta morfología es característica de los huevos de cestodos de la familia *Taeniidae* (figura n° 2).
Teniendo en cuenta las características de las formas evolutivas junto a la morfometría de los proglótides, *Spirometra* spp. se halló en el paciente 1, mientras que el felino residente en Esperanza estaba parasitado por *Taenia taeniaeformis.*

Discusión-conclusión
La amplia popularidad del gato doméstico como animal de compañía en los últimos años, ha provocado el incremento de su presencia en la consulta de la clínica veterinaria. De sus parasitosis, siempre se ha enfocado la atención en la toxoplasmosis, por las severas consecuencias en la población. Sin embargo, otros parásitos como *T. taeniaeformis* y *Spirometra* spp. también pueden ser importantes en este sentido. Ambos teniasis son zoonosis. Bacigalupo (1922) describe el hallazgo de *T. taeniaeformis* en un niño de Buenos Aires. El plerocercoide de *Spirometra* es el responsable de la esparganosis en el hombre, con diferentes localizaciones como: tejido subcutáneo, músculos superficiales, cerebro, medula espinal, ojo, escroto y mamas.
Consideramos relevantes estos hallazgos ya que estas teniasis intestinales del gato además de ser de infrecuente presentación en la rutina diaria del laboratorio de Análisis Clínicos, en la clínica no se observa sintomatología notable. No obstante, por el estrecho contacto que mantiene el hombre con estos animales de compañía, debe resaltarse su implicancia en la salud pública.
También creemos importante destacar las bondades que ofrece la técnica de Teuscher como método coproparasitológico de diagnóstico, ya que mediante la flotación y sedimentación permite en forma práctica demostrar diferentes formas evolutivas de parásitos gastrointestinales (quistes, ooquistes, huevos de trematodos, cestodos, nematodes y larvas) evitando tener que realizar exámenes especiales para cada forma parasitaria en particular.

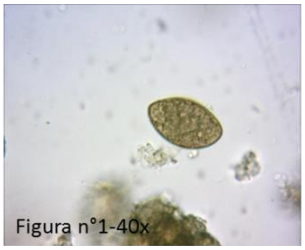


Figura n°1-40x

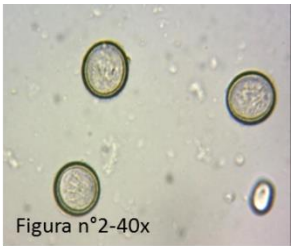


Figura n°2-40x

Bibliografía
Bono Battistoni, M.F.; Ruiz, M.F.; Orcellet, V.M.; Plaza, D.V.; Marengo, R.E.; Peralta, J.L. 2013. Manual de Diagnóstico Parasitológico Veterinario. Fondo Editor Allignani, Santa Fe, Argentina.
Castro, O.; Valledor, S.; Crampet, A.; Casás, G. 2013. Aporte al conocimiento de los metazoos parásitos del gato doméstico en el Departamento de Montevideo, Uruguay. Veterinaria. 49(190):28-37
Rosa, A.; Ribicich, M. 2012. Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.

P21- TRICHINELLOSIS EN JABALÍES DE LA PATAGONIA NORESTE: ESTUDIO MULTICÉNTRICO

M Winter[1], S Abate[1], M Pasqualetti[2], F Fariña[2], M Ercole[2], S Mancini[4], N Perera[4], MJ Corominas[4], D Kromberger[5], D Birochio[1], M Ribicich[2]
[1]Centro de Investigaciones y Transferencia Rio Negro (CONICET-UNRN), [2]Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, [3]CONICET – Universidad de Buenos Aires, Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA), [4]Unidad Regional de Epidemiología y Salud Ambiental- Laboratorio de Zoonosis, provincia de Río Negro, [5]Ejercicio privado de la profesión, DKVET.
mwinter@unrn.edu.ar

Introducción

La trichinellosis es una zoonosis parasitaria mundialmente distribuida. En nuestro país, es una enfermedad endémica que constituye un grave problema de salud pública dada las altas tasas de morbilidad que genera. La carne de jabalí (*Sus scrofa*) y productos derivados, representa la segunda fuente de trichinellosis humana en el mundo. El análisis de tejido muscular y la detección de larvas del género *Trichinella* mediante el método de digestión artificial (DA) previo a su consumo puede prevenir la trichinellosis clínica. El jabalí es una especie exótica invasora. En nuestro país su población se encuentra establecida y según algunas investigaciones en aumento. El objetivo del presente trabajo fue realizar detección de *Trichinella* spp. en jabalíes de vida libre destinados a consumo humano mediante DA.

Materiales y métodos

Se recopilaron resultados de análisis de trichinellosis por DA obtenidos entre los años 2014 y 2018 por cuatro laboratorios: un laboratorio de referencia (Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Universidad de Buenos Aires), y tres laboratorios de la comarca Viedma-Carmen de Patagones: Laboratorio de zoonosis (Universidad de Rio Negro), Laboratorio de la URESA (Ministerio de Salud de la Provincia de Río Negro) y laboratorio privado LabDK (Carmen de Patagones). Los métodos adoptados para el análisis coinciden con criterios del SENASA. Los puntos de captura de los ejemplares delimitan un perímetro de aproximadamente 600 Km^2 incluyendo el extremo sur de la provincia de Buenos Aires y el extremo noreste de la provincia de Río Negro (Fig. 1). La caza de jabalí se encuentra permitida y regulada en ambas provincias. Las muestras obtenidas, principalmente de diafragma, fueron analizadas mediante la técnica de DA: 470 en laboratorio veterinario privado y 492 en laboratorios pertenecientes a organismos públicos.

Figura 1. Área de estudio.

Resultados

Las 962 muestras de jabalí resultaron negativas a la presencia de *Trichinella* spp. mediante la técnica de DA.

Discusión y conclusión

Si bien la totalidad de los jabalíes resultaron negativos por la técnica de DA, debe tenerse en cuenta que *Trichinella* spp. podría estar circulando entre jabalíes de la zona de estudio con una carga parasitaria inferior a una larva por gramo. La aparición de brotes de trichinellosis se considera generalmente ligada a la dinámica socioeconómica del país ya que la caza de animales silvestres así como el incremento de la cría porcina doméstica, en ciertas circunstancias representan una medida de subsistencia (Fig. 2). Teniendo en cuenta que en Argentina la población de jabalíes se encuentra completamente establecida y según algunos investigadores en aumento y considerando el contexto socioeconómico, es importante sostener monitoreos regionales multicéntricos que permitan generar conciencia en la población.

Figura 2. Faena domiciliaria de jabalí.

Bibliografía

-Gamble HR, Pozio E, Bruschi F, Nöckler K, Kapel CMO, Gajadhar AA. 2014. International Commission on Trichinellosis: recommendations on the Use of Serological Tests for the Detection of *Trichinella* Infection in Animals and Man. Parasite, 11:3-13.
-Pasqualetti MI, Acerbo M, Miguez M, Rosa A, Fariña FA, Cardillo N, Degregorio OJ, Ribicich M. 2014. Nuevos aportes al conocimiento de Trichinella y trichinellosis. Rev Med Vet, 95 (2):12-21.
-Winter M, Abate S, Perera N, Mancini S, Corominas MJ, Ercole M, Fariña F, Pasqualetti M, Alonso B, Marcos A, Veneroni R, Castillo M, Birochio D, Ribicich M. 2018. Monitoreo de trichinellosis mediante digestión artificial y ELISA en jabalíes (*Sus scrofa*) de una región de la Patagonia noreste. Libro de resúmenes II Congreso Internacional de Zoonosis, 27.

P22- DETECCIÓN MEDIANTE DIGESTIÓN ARTIFICIAL E IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE DE *TRICHINELLA* EN MUESTRAS DE CERDOS, JABALIES Y PRODUCTOS PORCINOS EN ARGENTINA

M.T. Ruarte[1,2]; G. E. Morici[1]; y M. G. Dominguez[1]
1. Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
2. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica.
dominguez.mariana@inta.gob.ar

Introducción

La trichinellosis es una enfermedad parasitaria transmisible por los alimentos que afecta al hombre cuando come carne cruda o insuficientemente cocida de cerdo, presas de caza infectadas o salazones preparadas con estas materias primas. El agente causal es un nematodo perteneciente al género *Trichinella* spp que abarca varias especies con diferente distribución geográfica.

Actualmente se reconocen doce genotipos dentro de este género, nueve de rango especie como *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* (T3), *T, pseudospiralis* (T4), *T. murrelli* (T5), *T. nelsoni* (T7), *T. papuae* (T10), *T. zimbabwensis* (T11) y *T. patagoniensis* (T12) y tres que aguardan una clarificación taxonómica T6, T8 y T9, de los cuales 4 han sido encontradas en Argentina: *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis* y *T. patagoniensis* (Krivokapich *et al.*, 2012 y 2015). El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio retrospectivo desde enero de 2015 a junio de 2018 de la detección de larvas de *Trichinella* e identificación de las mismas a nivel de especie en muestras de cerdos, jabalíes y productos porcinos recibidos en nuestro laboratorio.

Materiales y métodos

Se analizaron un total de 58 muestras, de las cuales 41 fueron cerdos, 13 jabalíes y 4 productos chacinados porcinos, recolectados desde 2015 hasta junio de 2018 en distintas localidades de 2 provincias argentinas, algunos de los cuales estuvieron implicados en brotes humanos.

Las muestras se analizaron mediante la técnica de digestión artificial rápida (DAR) (Pepsina 1:1000 NF al 1%, HCL 37% fumante al 1%) en agitador térmico a 45 °C +/- 1 °C durante 45 minutos (Figura 1). Posteriormente se procedió a la la extracción de ADN con proteinasa K, seguido de la técnica nested-multiplex PCR de las secuencias repetidas del segmento de expansión V (ESV) y los espaciadores de los transcriptos internos (ITS1 e ITS2) del ADNr para identificar el genotipo al que pertenece. En los casos de amplificación positiva se procedió a la secuenciación del producto amplificado para confirmar por comparación con las secuencias depositadas en el GenBank (Zarlenga *et al.*, 1999).

Figura 1. Técnica DAR para el análisis de las muestras analizadas que permite la detección de larvas de *Trichinella*.

Resultados

De las 58 muestras analizadas, se encontraron larvas morfológicamente compatibles con *trichinella* en 6 muestras, que correspondieron a 5 cerdos y 1 jabalí. (Tabla 1). De todas ellas se obtuvo amplificación positiva por la técnica nested-multiplex PCR y la banda amplificada posee tamaño compatible y comparable con el control positivo de *T. spiralis* (173 pb).

Seguidamente se procedió a secuenciar el producto de PCR amplificado y dicha secuencia posee un 100% de identidad con la depositada en el GenBank para *T. spiralis* al realizarse el alineamiento con el programa CLUTALW; a modo de ejemplo se observa el resultado obtenido para la muestra de jabalí en la Figura 2.

Tabla 1 Infección por *Trichinella* en cerdos, jabalíes y subproductos porcinos.

	Cerdo		Jabalí	
Resultado DAR	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Embutido	-	4	-	-
Músculo	-	11	1	3
Diafragma	5	25	-	9
Total	5	40	1	12

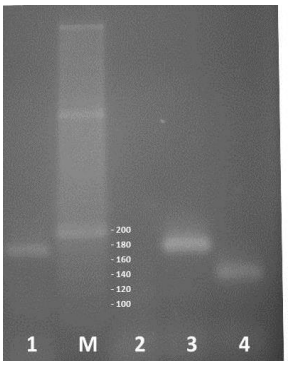


Figura 2. Nested-multiplex PCR a partir de ADN genómico. 1: jabalí; M: Marcador de tamaño de 20 pb; 2: Control negativo; 3: Control positivo *T. spiralis* y 4: Control positivo *T. patagoniensis.*

Discusión

Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que *T. spiralis* es la especie predominante en las muestras que se analizaron y resultaron positivas y que estuvieron involucradas en infecciones humanas en Argentina, lo que debe ser tenido en cuenta en la implementación de estrategias de prevención y control de esta zoonosis en el país.

Bibliografía

- Krivokapich, S.J., Pozio, E., Gatti, G.M., Prous, C.L., Ribicich, M., Marucci, G., La Rosa, G., Confalonieri V. 2012. Trichinella patagoniensis n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. Int J Parasitol. 42(10), 903-10.
- Krivokapich, S.J., Prous, C.L., Gatti, G.M., Saldía, L., 2015. First finding of Trichinella pseudospiralis in the Neotropical region. Vet Parasitol, 208(3-4), 268-71.
- Zarlenga, D.S., Chute, M.B., Martin, A., Kapel, C.M., 1999. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of Trichinella. Int. J. Parasitol. 29, 1859–1867.

P23- DETERMINACIÓN DE LOS GÉNEROS DEL ORDEN STRONGYLIDA PRESENTES EN ESTABLECIMIENTOS DE PRODUCCIÓN EQUINA DE LA REGIÓN CENTRAL DE ARGENTINA

L. Zavattieri[1]; R. Peñafort[1]; V. Frechero[1]; J. Bertone[1]; N. Illanes[1]; G. Bagnis[1]; L. Zapata[1]; R. Rivero[2]; H. Lovera[1] y C. Motta[1]
[1]Enfermedades transmisibles y tóxicas de los pequeños animales, FAV-UNRC. [2] Instituto Nacional de Medicina Tropical.
cmotta@ayv.unrc.edu.ar

Introducción. Las enfermedades de origen parasitario son una de las patologías más frecuentes que pueden ocasionar perdidas en la producción equina. Los vermes gastrointestinales producen cuadros subclínicos que provocan pérdidas en el desarrollo corporal y en el rendimiento de los animales. La familia Strongilidae está compuesta por varios géneros, principalmente grandes y pequeños estróngilos. Su ciclo se clasifica como directo, ya que los equinos se infestan por la ingestión de la larva de tercer estadío (L3), que se encuentra en las pasturas. Entre las especies de grandes estróngilos que parasitan a los equinos se encuentran: *Strongylus vulgaris, S. edentatus* y *S. equinus*. Estos parásitos una vez ingeridos por los equinos, migran por arterias u órganos abdominales para finalmente alcanzar el intestino grueso como adultos jóvenes, donde maduran y copulan. Los huevos son eliminados con la materia fecal y la eclosión de éstos en el ambiente, origina las larvas que contaminan las pasturas. El más conocido de los grandes estróngilos y el de mayor patogenicidad es *S. vulgaris*, cuya migración larval por la arterias mesentéricas puede dar lugar al desarrollo de arteritis tromboembólica y a severos cólicos isquémicos, en muchos casos fatales. Debido a su mayor frecuencia que el resto de los grandes estróngilos, se debe tomar siempre en cuenta en el diagnóstico de cólicos en los equinos. Por otro lado, los pequeños estróngilos son un grupo de nemátodos no migratorios considerados los parásitos de mayor prevalencia y prácticamente todos los equinos en pastoreo adquieren estos nemátodos (Reinemeyer y Nielsen, 2013). Su forma propagativa al igual que el resto de los integrantes de la familia Strongylididae es a través del huevo tipo estrongilido. Por lo tanto el diagnóstico de la presencia de estadios adultos de *S. vulgaris* y de pequeños estróngilos en la mucosa del intestino grueso se realiza mediante la técnica de cultivo de larvas, Henriksen y Korsholm 1983 modificada. Por lo mencionado anteriormente, este trabajo propone identificar los distintos géneros y especies del orden Strongylida presente en equinos.

Materiales y métodos. Se muestrearon 12 establecimientos de producción equina de la región central de Argentina. Se obtuvieron muestras individuales de materia fecal, las cuales se colocaron en una conservadora de telgopor con refrigerantes y se procesaron en el laboratorio de parasitología- Dpto. de Patología Animal-UNRC, mediante la técnica de McMaster modificado. Las muestras con recuentos de huevos por gramo (HPG) superiores a 200, se destinaron para realizar los cultivos de larvas según la técnica de Henriksen y Korsholm modificada. Esta técnica de coprocultivo se basa en promover la maduración y eclosión de los huevos y la evolución de las larvas hasta el tercer estadío (L3 infestante). Su éxito depende de tres factores: humedad, temperatura y oxigenación. Luego de 15 días se recuperaron las larvas en un vaso cónico, se colocó una alícuota en un portaobjeto con una gota de lugol y se observaron 100 larvas en estadío L3 por cultivo al microscopio óptico para realizar la identificación de las especies presentes. Se clasificaron de acuerdo a las diferencias morfológicas: longitud total de la larva, longitud de cola y número de células intestinales.

Resultados. Se muestrearon 280 equinos pertenecientes a 12 establecimientos y se realizaron 71 cultivos de larvas en total. El promedio de HPG fue de 431. En el 100% de los cultivos realizados se observó la presencia de larvas de pequeños estróngilos, en el 50% de *S. equinus*, 33% de *S. vulgaris*, 25% de *S. edentatus* y 17% de *Trichostrongylus axei*.

Tabla: Porcentaje de cultivos positivos para cada género y especie del orden Strongylida en cada establecimiento

Establecimientos	TA	PS	SV	Sed	Seq
Achiras	0%	100%	0%	0%	0%
Aniceto	0%	100%	0%	0%	0%
Carreros	0%	100%	0%	0%	0%
Corral de Busto	0%	100%	0%	0%	0%
La Escondida	66%	100%	33%	0%	67%
López	0%	100%	13%	25%	63%
Los Pinos	0%	100%	22%	33%	56%
Ranquel	0%	100%	0%	0%	0%
Santa Rita	0%	100%	0%	0%	67%
Sol de Agosto	25%	100%	0%	25%	50%
Tazioli	0%	100%	16%	0%	63%
Venado Tuerto	0%	100%	0%	0%	0%

TA: *Trichostrongylus axei*, PS: pequeños estróngilos, SV: *S. Vulgaris*, Sed: *S. edentatus*, Seq: *S.equinus*

Discusión. Coincidiendo con lo reportado por Scott *et al.* (2015) en su publicación respecto a la alta prevalencia a nivel mundial de pequeños estróngilos, en nuestro trabajo se corroboró que la totalidad de los establecimientos presentaron esta clase de vermes. El porcentaje de cultivos positivos para *S. equinus y S. edentatus* podría estar sobreestimado debido a la dificultad de diferenciar las larvas de estas especies con las de *Poteriostomum* sp. y *Triodontophorus* sp. Las L3 de *S. vulgaris* fueron notoriamente distinguibles debido al número de células intestinales y su mayor tamaño (Reinemeyer y Nielsen, 2013). Por otro lado, debido a que los tratamientos antiparasitarios utilizados en la mayoría de las poblaciones de Argentina se basan en el uso de lactonas macrocíclicas, los grandes estróngilos tienden a disminuir su presentación y actualmente su prevalencia es mucho menor, llegando a veces a ser nula respecto a los pequeños estróngilos. Es de suma importancia tener en cuenta estos resultados para la prevención y el tratamiento de estas parasitosis, ya que si bien la prevalencia de pequeños estróngilos es muy alta, no descarta la presencia de los grandes estróngilos que pueden causar cuadros peligrosos para la vida de los equinos y que su diagnóstico muchas veces es ignorado o confundido con otras patologías. La utilización del coprocultivo como método de diagnóstico, brinda información certera acerca de los géneros del orden Strongylida hallados en cada establecimiento, permitiendo establecer un correcto protocolo de control que evite el uso indiscriminado de antiparasitarios y su aplicación en épocas incorrectas.

Bibliografia

Scott, I.; Bishop, R. y Pomroy, W. (2015). Anthelmintic resistance in equine helminth parasites – a growing issue for horse owners and veterinarians in New Zealand? N. Z. Vet. J. 63: 188-198.

Henriksen, S y Korsholm, H. 1983. A method for culture and recovery of gastrointestinal strongyle larvae. Nord. Vet. Med., 35:429-430.

Reinemeyer, C. y Nielsen, M. (2013). Handbook of equine parasite control. 1° Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA.

P24- CARACTERIZACIÓN DE LA CISTEIN PROTEASA 8 EN DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *T. FOETUS* DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

M.L.Doumecq[1]; A. Forletti[2]; J.P.Liron[3]; C. Cacciato[1,4]; C. Monteavaro[1]; P. Soto[1, 2]
[1]Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental, FCV-UNCPBA. [2]BIOTANDIL (Laboratorio biológico Tandil SRL). [3]Civetan.
[4]Personal de Apoyo CICPBA. ldoumecq@vet.unicen.edu.ar

Introducción

Tritrichomonas foetus (T. foetus) es el agente causal de la Trichomonosis venérea bovina. El principal mecanismo de patogenicidad es la adherencia a células del tracto reproductor y posterior daño tisular. Las proteasas extracelulares, de las cuales las cisteinproteasas (CPs) son las de mayor importancia en la patogenia de *T. foetus*, juegan un rol importante en las interacciones entre el huésped y el protozoario tales como la virulencia, adherencia, adquisición de nutrientes y en los procesos de la inflamacion. También favorecen al protozoo a evadir la respuesta inmune debido a la degradación de IgA e IgG localizadas en vagina y útero respectivamente. Este mecanismo permite una mayor resistencia del protozoario y en determinadas y contribuir a la persistencia de la infección en las hembras.

Muchos autores realizaron estudios genéticos de estas CPs y reportaron la secuencia de ADN de la CP8 de *T. foetus* (Lucas et al. 2008). La comparación de las secuencias de amino acidos y nucleotidos de la CP8 de *T. foetus* aisladas de bovinos y de felinos revelaron variaciones o polimorfismo nucleotidicas entre ellas. (Sun et al. 2012). Hasta el momento, aunque se han reportados múltiples CPs las más importantes secretadas por *T. foetus* son la CP30 y la CP8, estas proteasas producen citotoxicidad y apoptosis de células epiteliales vaginales y uterinas y también en diferentes líneas celulares. Durante nuestros trabajos sobre la caracterización patogénica y molecular de diferentes aislamientos de *T. foetus,* hemos observado variabilidad sobre el efecto citopático en líneas celulares CHO entre los aislamientos (Doumecq et al.2012). Por lo tanto, teniendo en cuenta el rol patogénico de las CP nos planteamos como objetivo caracterizar el gen que codifica CP8 en los diferentes aislamientos de *T. foetus* mediante PCR y evaluar si existe polimorfismo en el promotor del gen para dicha enzima mediante secuenciación.

Materiales y métodos

Nuestro cepario de *T. foetus* está conformado por 102 aislamientos de raspajes prepuciales de toros de distintos partidos de la provincia de Buenos Aires. Para los ensayos de caracterización patogénica y molecular fueron seleccionados 25 aislamientos de 13 partidos diferentes de la provincia de Buenos Aires.

Extracción del ADN: se tomó 1 ml del cultivo, se realizaron dos lavados con PBS a 1500 G durante 10 minutos. El pellet en una concentración de 500.000 *Tf*/ml fue resuspendido en agua destilada, incubado a 100°C y tratado con proteinasa K. Luego de centrifugar, el sobrenadante (ADN templado) fue conservado a -20°C. Los primers utilizados para caracterizar el gen de la CP8 fueron F56-CGCATCCTGCGCTTATTATC y R6-GTCCATACGGAAACCAAGGA que amplifican 235 pb GenBank: EF610628.1. El Mix de reacción de PCR fue: buffer Taq 1x, $MgCl_2$ 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 4 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C 40s, hibridación a 60°C 40s y extensión a 72°C 40s. 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 70V, coloreados con GelRed y observados con transiluminador UV.

Para el segundo objetivo se seleccionaron 4 aislamientos con diferente grado de efecto citopático sobre línea celular CHO y de distinta región geográfica:

Aislamiento	Ef. citopático	Región geografica
TR 52	moderado	Chascomús
TR 67	bajo	Azul
TR 83	moderado	Ayacucho
TR 113	alto	Saliqueló

La extracción de ADN y el mix de reacción para la PCR se realizaron con la metodología mencionada anteriormente. Los primers para amplificar el promotor de la CP8 fueron F-GTGGAAG TTTCTTCGTTCTTGAAG
T y R-ATGCGAGGGAAGCAAGAACT que amplifican 459 pb. La región amplificada comprende 421 nucleótidos del promotor y 28 nucleótidos del primer exón. Programa de amplificación: incubación inicial de 4 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C 40s, hibridación a 54°C 40s y extensión a 72°C 40s. La amplificación fue concluida con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Para separar los amplicones se utilizó la metodología comentada anteriormente. La secuenciación se realizó en el laboratorio IGEVET (La Plata). Las secuencias se revisaron con el programa BioEdit. Secuencia de referencia: publicada en GenBank MLAK01000623.1 correspondiente al genoma de *Tritrichomonas foetus* strain K, scaffold_226.

Resultados

Los 25 aislamientos amplificaron una banda de 235 pb correspondiente a la presencia del gen de la CP8.

Entre los aislamientos secuenciados no se encontraron polimorfismos genéticos siendo las cuatro aislamientos idénticos a la secuencia reportada en GenBank.

Discusión y conclusión

Una búsqueda y alineamiento de secuencias de la región codificante del gen CP8 publicadas en GenBank demostró la ausencia de polimorfismos genéticos en los genotipos bovinos de *T. foetus.* Con el fin de ampliar la zona previamente reportada de este relevante gen se secuenciaron 421 nucleótidos correspondientes a la región promotora, sin embargo no se hallaron polimorfismos genéticos en los aislamientos secuenciados de las distintas regiones estudiadas. Hasta el momento, la información obtenida indicaría que las variantes fenotípicas encontradas como el diferente grado de desprendimiento de la monocapa en la línea celular CHO no estarían originadas por variantes alélicas del gen CP8.

Bibliografía

-Doumecq M.L.; Monteavaro, C.; Soto, P.2012. Variación del efecto citopático entre diferentes cepas de *Tritrichomonas foetus* sobre línea celulares CHO. XIX Reunión Científico Técnica de la AAVLD, CABA -

-Lucas,J.; Hayes, G.; Kalsi, H.; Gilbert, R.; Choe,Y.; Craik, C.; Singh,B. 2008. Characterization of a cysteine protease from Tritrichomonas foetus that induces host-cell apoptosis. Arch Biochem Biophys.15;477(2):239-43

-Sun,Z.; Stack,C.; Šlapeta, J.; 2012. Sequence differences in the diagnostic region of the cysteine protease 8 gene of *Tritrichomonas foetus* parasites of cats and cattle. Vet Parasitol. 186, 445-449

P25- IDENTIFICACIÓN DE *CRYPTOSPORIDIUM* spp. EN LECHONES DE GRANJAS INTENSIVAS Y SU ASOCIACIÓN CON LOS DISTINTOS TIPOS DE MANEJO

L. De Felice[1*], E. Bonzo[2], G. Moré[1,3]., LM. Campero [1,3], M.C. Venturini[1], J.M. Unzaga[1]
[1]Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA) Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. [2]Cátedra de Higiene, Epidemiología, y Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. [3]CONICET
[*]ldefelice@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

Cryptosporidium spp. es un protozoario cosmopolita que afecta hospedadores vertebrados incluido el hombre. En cerdos forma parte del complejo de diarrea predestete, ocasionando graves pérdidas económicas a nivel mundial. Los datos de prevalencia (1,4% a 33,2%) varían según los países y los diferentes sistemas de manejo. En Argentina prevalecen los sistemas de cría intensiva de pequeña y mediana escala sin embargo en los últimos años se han instalado establecimientos altamente tecnificados. Hasta el momento se desconocen datos que cuantifiquen la presencia del parásito en establecimientos porcinos de nuestro país.

Los objetivos de éste trabajo fueron determinar la tasa de infección de *Cryptosporidium* spp. en cerdos de granjas intensivas en la categoría de maternidad y determinar la asociación entre animales con presencia de ooquistes compatibles con *Cryptosporidium* spp. y las diferentes variables evaluadas en los establecimientos.

Materiales y métodos

Se analizaron 400 muestras de materia fecal de lechones predestete pertenecientes a 13 granjas de cría intensiva de las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Santa Fé, Córdoba, Entre Ríos y Misiones. Se clasificaron como normales o diarreicas. El diagnóstico coproparasitológico se llevó a cabo mediante concentración de la materia fecal por sedimentación-flotación y coloración con Ziehl-Neelsen modificado (ZNM). En cada establecimiento se recolectaron datos acerca de la producción, infraestructura y estado sanitario mediante una encuesta. Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables estudiadas. Se utilizó la prueba de Chi cuadrado con el fin de determinar la asociación entre animales con presencia de ooquistes compatibles con *Cryptosporidium* spp. en la categoría analizada y las diferentes variables evaluadas en la encuesta. Se consideró significativo un valor de p≤ 0,05 y se trabajó con un 95% de confianza.

Resultados

En un total de 37 muestras de materia fecal se observaron al microscopio óptico estructuras compatibles con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. considerándose como animales positivos. La tasa de infección en la categoría maternidad fue 9,25% (37/400) El resultado positivo presentó asociación con dos variables cualitativas. La presencia de una partición entre los corrales por medio de reja estuvo significativamente asociada al resultado positivo (p=0,0018). Entre las variables de sanidad, la presencia de diarrea estuvo significativamente asociada (p= 0,0116). Se consideró a la presencia de la reja y a la diarrea como factores de riesgo de enfermedad .

Tabla 1. Tabla de contingencia: asociación entre animales positivos y partición entre corrales

		Resultado		total
		negativo	positivo	
partición	reja	48	12	60
	sólido	315	25	340
	total	363	37	400

Chi cuadrado= 9,718 **Grados de libertad**=1 **p**= 0,0018

Tabla 2. Tabla de contingencia: asociación entre animales positivos y presencia de diarrea

		Resultado		total
		negativo	positivo	
diarrea	no	177	10	187
	si	186	27	213
	total	363	37	400

Chi cuadrado= 6,371 **Grados de libertad**= 1 **p**= 0,0116

Discusión y conclusión

Los resultados demuestran una tasa de infección moderada para *Cryptosporidium* spp. en la categoría estudiada.

De los datos analizados mediante las encuestas, dos variables resultaron estar asociadas al resultado positivo. La presencia de rejas entre corrales en lugar de una partición sólida, facilitaría la diseminación de los ooquistes. La presencia de diarrea en maternidad sugiere un estado sanitario deficiente y su asociación con *Cryptosporidium* spp. coincide con lo reportado a nivel mundial.

El resto de las variables no presentó asociación con el resultado positivo, lo que refleja una homogeneidad en el sistema de manejo de los establecimientos estudiados.

Bibliografía

-Karel Němejc, Bohumil Sak, Dana Květoňová, Naděžda Kernerová, Michael Rost, Vitaliano A. Cama, Martin Kváč. Occurrence of Cryptosporidium suis and Cryptosporidium scrofarum on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. Parasitol Res (2013) 112:1143–1154

-G. Schares, N. Pantchev, D. Barutzki, A.O. Heydorn, C. Bauer, F.J. Conraths. Oocysts of Neospora caninum, Hammondia heydorni, Toxoplasma gondii and Hammondia hammondi in faeces collected from dogs in Germany. International Journal for Parasitology 35 (2005) 1525–1537

P26- IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Sarcocystis gigantea* EN UN OVINO

L. Artía[1*], I. Gual[1], M.E. Rivera[1], L. Colque Caro[1], M.V Scioli[1], M. Spetter[1], E. Morrell[1], G.J. Cantón[1], D.P. Moore[1], G. Moré[2]
[1]INTA EEA Balcarce.[2]FCV UNLP.
*eeabalcarce.residsa@inta.gob.ar

Introducción

Las especies del género *Sarcocystis* spp. son protozoarios del Phylum Apicomplexa, productores de quistes tisulares, de ciclo indirecto y distribución mundial, que afectan a diversas especies de animales homeotermos y poiquilotermos. Los ovinos son hospedadores intermediarios de cuatro especies: *S. tenella, S. arieticanis*, *S. medusiformis* y *S. gigantea*; los hospedadores definitivos (HD) de las 2 primeras son los cánidos, mientras que el HD de las 2 últimas es el gato doméstico. La forma de infección de los ovinos es el consumo de esporocistos eliminados en las heces de los HD (Dubey *et al*., 2015). Los quistes de *S. gigantea* son macroscópicos, detectándose en el músculo del esófago, laringe, lengua y en menor medida del diafragma; son ovales o fusiformes, blanquecinos y pueden medir hasta 1 cm de diámetro. *S. gigantea* es un parásito levemente patógeno para los ovinos, siendo la infección crónica y generalmente subclínica. Si bien la infección suele ser un hallazgo incidental y la prevalencia en las majadas es baja, la presencia de quistes musculares es razón de decomiso del tejido afectado. La infección por *S. gigantea* en América ha sido reportada previamente en base a observaciones morfológicas (Damboriarena *et al*., 2016). En Argentina, el primer caso de identificación molecular fue reportado por Gual *et al*. (2017). El objetivo del presente trabajo es realizar una descripción morfológica y molecular completa de *S. gigantea* en un caso de infección natural en un ovino.

Materiales y métodos

Se recibió una oveja Corriedale de 14 años de edad, proveniente de un establecimiento ubicado en el partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires. La oveja tenía una historia de pérdida progresiva de condición corporal y se mantuvo postrada durante 4 días previos a la consulta. Se revisó clínicamente y se instauró antibióticoterapia empírica y administración de magnesio por vía endovenosa sin respuesta satisfactoria, por lo que se procedió a la eutanasia *in extremis*. Se realizó el examen *post mortem* donde se recolectaron muestras de tejidos en formol tamponado al 10% para estudios histopatológicos de rutina (tinciones hematoxilina/ eosina [H&E] y PAS) y quistes macroscópicos de músculos esofágicos fueron refrigerados para estudios moleculares y en glutaraldehido al 2% para microscopía electrónica de transmisión (MET). La extracción de ADN y posterior amplificación, secuenciación y análisis de la secuencia obtenida de la región génica 18S rRNA se realizaron según Gual *et al*. (2017). El árbol filogenético se construyó con el software MEGA 7 por el método de Máxima Parsimonia (1000 réplicas).

Resultados

Al examen clínico, el animal presentó 41°C de temperatura corporal, 133 latidos/minuto de frecuencia cardíaca, 10% de deshidratación, condición corporal 2 (escala 1-5) y aparente anemia (palidez de la mucosa labio-gingival, conjuntival y tercer párpado). A la necropsia se observaron múltiples estructuras nodulares blanquecinas en el esófago, sobreelevadas desde la serosa, de 5-10 mm de diámetro. Microscópicamente, los macroquistes estaban compuestos por una pared externa (secundaria) de tejido conectivo denso, fibroblastos y fibrocitos y una pared interna (primaria) con vellosidades (tinción PAS positiva), de la cual se originaban septos que rodeaban estructuras parasitarias basofílicas (bradizoitos). En la región adyacente a la pared interna, se observaron metrocitos. Además, los músculos masetero, aductor, diafragma, lengua, miocardio y capa muscular del esófago presentaron múltiples quistes de 25-50 µm de diámetro, con estructuras basófilas en su interior compatibles con microquistes de *Sarcocystis* spp. La MET permitió observar las microvellosidades de la pared primaria en forma de "coliflor", características de *S. gigantea*. La amplificación de la región génica 18S rRNA de *S. gigantea* mediante PCR arrojó un resultado positivo. La secuencia obtenida mostró 100% de coincidencia con secuencias de *S. gigantea* (GenBank: KC209733 y MF769582). La secuencia obtenida se ubicó en un mismo clado que otras secuencias de *S. gigantea* (Figura 1).

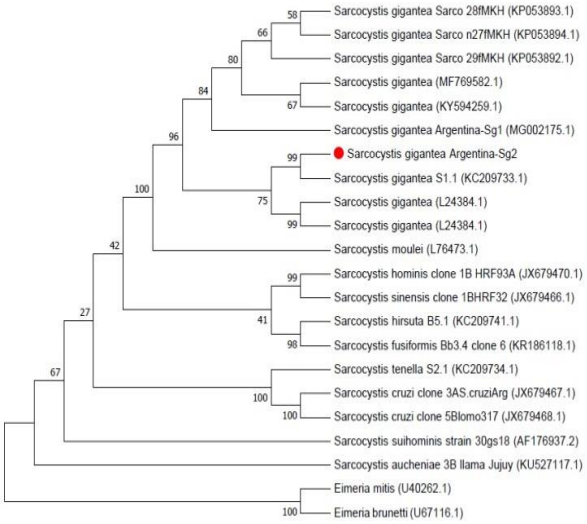


Figura 1: análisis filogenético de la región génica 18S rRNA. La secuencia obtenida en este estudio se identifica con un punto rojo.

Discusión y conclusión

Con el objetivo de complementar lo estudiado previamente (Gual *et al*., 2017), este trabajo permitió: realizar un examen clínico del animal afectado previo a su muerte; obtener muestras de mejor calidad para su estudio microscópico y molecular; caracterizar una secuencia más grande del genoma; obtener una tinción PAS positiva y estudiar los quistes mediante MET. Teniendo en cuenta la edad promedio de faena en nuestro país y el prolongado tiempo que transcurre desde la infección hasta el desarrollo de los quistes macroscópicos, se presume que la prevalencia de infección con *S. gigantea* en ovinos de Argentina es subestimada. Sería necesario llevar a cabo estudios para evaluar el impacto clínico-patológico y económico de la infección por *S. gigantea* en Argentina.

Bibliografía

-Damboriarena *et al*., 2016. Ciência Rural, Santa Maria, v.46, n.7, p.1229-1233.
-Dubey *et al.,* 2015. Sarcocystosis of Animals and Humans. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–481.
-Gual *et al.*, 2017. Vet. Parasitology 248, 25–27.

P27- PARÁSITOS INTERNOS Y EXTERNOS EN BOVINOS DE LECHE EN UNA ESCUELA AGROPECUARIA EN CORRIENTES, ARGENTINA

J.D. Álvarez[1]; T. Rigonatto[1]; S.E. Ramírez[1]; L.S. Basualdo[1]; E.I Martínez[1].
[1]Cátedra Enfermedades Parasitarias FCV-UNNE
parasito@vet.unne.edu.ar

Introducción

La acción de los parásitos sobre la producción lechera ha sido fuente de controversia y el beneficio de las desparasitaciones sobre las vacas en lactación presenta resultados variables en la bibliografía tanto nacional como internacional. De lo que no hay dudas es que las etapas de cría y recría de terneras de reposición deben ser consideradas de alto riesgo, de no ser de esta manera podría ocurrir un probable retraso en el crecimiento, lo que impediría que las vaquillas puedan ser inseminadas o entoradas a más temprana edad, con todas las consecuencias productivas que ello acarrea. El presente trabajo se realizó en la Escuela Regional de Agricultura, Ganadería e Industrias Afines (ERAGIA) del departamento Capital (Corrientes), Argentina. El objetivo del mismo fue el diagnostico de parásitos internos y externos en ganado bovino lechero y su dinámica anual.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en la Unidad de Tambo con ordeñe mecanizado de la ERAGIA, durante el período de agosto de 2017 a junio de 2018. Cada 21 días se recolectó muestras de materia fecal directamente del recto de todas las categorías animales para determinar huevos por gramo de nematodes mediante la técnica de Mc Master modificada (Roberts y O' Sullivan, 1949) y sedimentación especial para huevos de trematodes (Dennis Stone Swanson, 1954). Los ectoparásitos hallados a la inspección fueron recolectados en envases con tapa a rosca para su posterior identificación. Durante el período de estudio los bovinos de diferentes categorías pastorearon el mismo potrero, y las pariciones se produjeron entre febrero y abril. Las desparasitaciones se realizan según los resultados diagnósticos. Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de la Cátedra de Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional Del Nordeste.

Resultados

Observamos que durante nuestro estudio, las vaquillas de reposición no presentaron cambios en su HPG, siendo los mismos muy bajos, igual sucede en vacas de lactación. En cambio en terneros nacidos desde febrero hasta abril 2017, los HPG se elevan, sobre todo en febrero como se representa en la tabla 1. Además pudimos observar huevos de Fasciola hepatica en vaquillas al inicio del otoño, dato inédito para el sistema en el cual se realizó el trabajo, a raíz de lo cual se lleva a cabo un pequeño relevamiento geográfico en busca de características adecuadas para el desarrollo del huésped intermediario de la misma.

Se encontraron garrapatas en terneros en febrero de 2018; en vacas en primavera y en vaquillas en otoño de 2018. Mosca de los cuernos es encontrada en todas las categorías.

Discusión

El uso de riego para mejorar la calidad y cantidad de forraje a los animales, también produce un incremento del hábitat para *Lymnaea* que puede ampliar el área de endemismo (Olaechea, 2004).

La aparición de mosca de los cuernos en todas las categorías ocurre, al igual que en la zona Central de la Argentina, como lo menciona Anziani, 2010.

Conclusión

La categoría más afectada por endoparásitos resulta ser la de terneros. En cambio los ectoparásitos afectan a todas las categorías en diferentes épocas del año.

Bibliografía

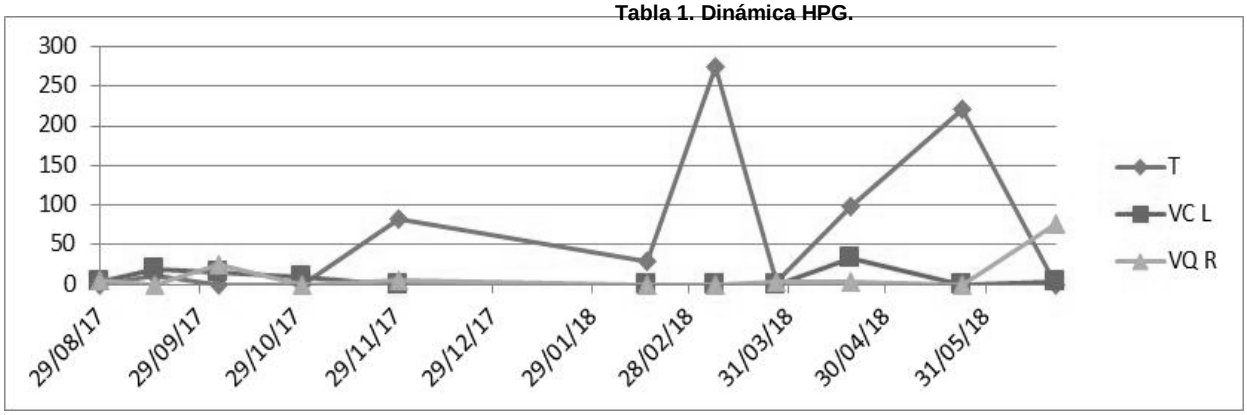
-Anziani, O.S., 1996. Epidemiología y control de dípteros que parasitan a los bovinos en el área central de la Argentina. En Dípteros Plaga de Importancia Económica y Sanitaria. Serie de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria Nº 20, pp 33-44

-Anziani, Oscar y Suarez Archilla, Guillermo. 2017. Guía para el control de los parásitos externos en bovinos de leche del área central de la Argentina VOL 2. Publicación Miscelánea Año V - Nº2. ISSN en linea-2314- 3126 INTA Ediciones. Colección Recursos. ISBN: 978-987-521-786-7. 20 pág.

-Odriozola, Ernesto Enfermedades de los bovinos con signos nerviosos. - 1a ed. - Buenos Aires: PROSAP, 2013. 112 p.

-Olaechea, Fermin, Red de Helmintología de FAO para América Latina y el Caribe Conferencia Electrónica 2004 Septiembre 2004

Tabla 1. Dinámica HPG.



T: Terneros nacidos febrero-abril 2017; **VC L**: Vacas en Lactación; **VQ R:** Vaquillas de Reposición

PATOLOGÍA CLÍNICA

PC1- FASTest® EHRLICHIA CANIS E INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN EL DIAGNÓSTICO DE EHRLICHIOSIS CANINA

D. F. Eiras[1,2], M. V. Vázquez[1], C. F. Scodelaro[1], A. Leidinger[3], A. Kern[3]
[1]Laboratorio DIAP (Diagnóstico en Animales Pequeños), Pueyrredón 1098, Banfield, Buenos Aires, Argentina. [2]Laboratorio de Inmunoparasitología, Departamento de Epizootiología y Salud Pública, FCV, UNLP, 60 y 118, La Plata, Buenos Aires, Argentina. [3]Megacor Diagnostik GmbH, Lochauer Str. 2 A-6912, Hoerbranz, Austria. e-mail: diegoeiras@diap.com.ar

Introducción

Ehrlichia canis es una bacteria intracelular obligada, gram-negativa, pleomórfica, que infecta a los monocitos, macrófagos y linfocitos, formando agregados bacterianos recubiertos por membrana denominados mórulas. Es el principal agente causal de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (siglas en inglés: CME), transmitido por ninfas y adultos de la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. La CME posee distribución mundial y forma parte de las enfermedades transmitidas por garrapatas en perros como la hepatozoonosis y la piroplasmosis. La enfermedad puede presentarse a cualquier edad y sexo, aunque podría estar más presente en animales adultos y en machos. Todas las razas son susceptibles de contraer CME, sin embargo, el Pastor Alemán y el Husky siberiano son propensos a desarrollar signos clínicos más severos. La presentación puede ser aguda, sub-clínica o crónica. Las manifestaciones clínicas generales incluyen: letargia, anorexia, fiebre, linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, pérdida de peso, mucosas pálidas, anemia, epistaxis, petequias, equimosis, sangrado prolongado durante el estro, hematuria o melena asociados con trombocitopenia, trombocitopatía o vasculitis. También puede haber signos oculares como uveítis anterior, hipema, desprendimiento retiniano o ceguera. Las manifestaciones pueden variar dependiendo de la cepa, la respuesta inmune del perro y la presencia de infecciones concomitantes con otros patógenos. La fase aguda puede durar 2 a 4 semanas. La fase subclínica sigue a la etapa aguda y los perros pueden permanecer como portadores asintomáticos por meses o años. No todos los perros infectados avanzan a la etapa crónica. En esta fase, los pacientes muestran hipoplasia de la médula ósea y pancitopenia severa. Aunque el examen de los frotis sanguíneos para la observación de mórulas es valioso durante la fase aguda, el diagnóstico de laboratorio más usual se realiza mediante serología. El test de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos IgG anti-*E. canis* es considerado el "*gold standard*" serológico. La inmunocromatografía (IC) -aunque menos sensible-, posee como ventajas la obtención de resultados rápidos y la facilidad de su ejecución. El objetivo del presente estudio fue evaluar la IC como test rápido, en comparación con la IFI como método de referencia para el diagnóstico de CME.

Materiales y métodos

Se testearon 116 sueros caninos con el test rápido inmunocromatográfico FASTest® EHRLICHIA canis (Megacor, Austria) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó la técnica de IFI MegaFLUO® EHRLICHIA canis (Megacor, Austria) a la dilución 1/80 como referente de control. Los sueros fueron seleccionados de acuerdo con los siguientes criterios: (1) 37 sueros provenientes de muestras de sangre positivas a la observación microscópica de mórulas de *E. canis* en los monocitos. (2) 79 sueros de muestras negativas a la observación microscópica de mórulas de *E. canis*. Este último grupo fue subdividido en: (2.1) 10 positivos a la observación de gamontes de *Hepatozoon* sp. (2.2) 10 positivos a la observación de merozoítos de piroplasmas (2.3) 10 positivos a la observación de mórulas de *Anaplasma platys*. (2.4) 9 positivos a *Leishmania* sp. mediante IFI. (2.5) 10 positivos a *Toxoplasma gondii/Neospora caninum* mediante IFI. (2.6) 10 positivos a *Brucella canis* mediante R-SAT. (2.7) 10 positivos a *Dirofilaria immitis* mediante IC. (2.8) 10 sueros negativos a todos los patógenos mencionados. La concordancia de los resultados fue evaluada mediante la obtención del coeficiente Kappa de Cohen, según la interpretación de Landis y Koch (1977).

Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla A. La concordancia entre las pruebas IFI MegaFLUO® EHRLICHIA canis y FASTest® EHRLICHIA canis resultó adecuada (índice Kappa 0,688).

Tabla A.	IFI 1/80 pos.	IFI 1/80 neg.	Total
FASTest® Ehrlichia pos.	44	11	55
FASTest® Ehrlichia neg.	7	54	61
Total	51	65	116

La Tabla B muestra los resultados de ambas pruebas en los diferentes grupos de sueros estudiados.

Tabla B. Grupos de sueros testeados	N	IFI 1/80		FASTest® EHRLICHIA canis	
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
1 Positivo a mórulas de *E. canis*	37	35	2	34	3
2 Negativos a Mórulas de *E. canis*	79	16	63	21	58
2.1 Gamontes de *Hepatozoon* sp.	10	1	9	6	4
2.2 Merozoítos de piroplasmas	10	3	7	6	4
2.3 Mórulas de *Anaplasma platys*	10	4	6	2	8
2.4 *Leishmania* sp. (IFI)	9	1	8	0	9
2.5 T. *gondii/ N. caninum* (IFI)	10	2	8	3	7
2.6 *Brucella canis* (R-SAT)	10	1	9	0	10
2.7 *Dirofilaria immitis* (IC)	10	3	7	4	6
2.8 Negativo a todo	10	1	9	0	10

Discusión

La prueba de IFI posee mayor sensibilidad analítica, permite obtener resultados cuantitativos indicando la exposición al agente y evaluar la seroconversión si se realiza nuevamente el estudio con un intervalo de 2 a 4 semanas de diferencia. De esta manera puede ser una herramienta útil para diferenciar la exposición crónica de una infección reciente. El test de IC, a pesar de su menor sensibilidad, proporciona resultados cualitativos rápidos, con escaso entrenamiento para su realización y sin la necesidad de equipamiento sofisticado. Debido a que la IFI es considerada la prueba de referencia para el diagnóstico de CME, en el presente estudio la IC mostró resultados falsos positivos, principalmente en los sueros positivos a otros patógenos diferentes a *E. canis*. Esto puede observarse cuando los datos de los subgrupos 2.1 (*Hepatozoon* sp.), 2.2 (piroplasmas), 2.5 (*T. gondii/N. caninum*) y 2.7 (*Dirofilaria immitis*) no son considerados. En este caso se obtiene un grado de concordancia excelente (0.843) y no aparecen resultados falsos positivos por IC (datos no mostrados). En consecuencia, se presume que la IC para *E. canis* posee resultados falsos positivos debido a reacciones cruzadas en pacientes con infecciones causadas por otros patógenos. Resultados preliminares indican que FASTest® EHRLICHIA canis puede reaccionar de manera cruzada con agentes rickettsiales y resulta de interés en futuros estudios. El diagnóstico serológico de CME puede ser complejo, difícil de interpretar y requiere de la evaluación conjunta de la clínica del paciente, los hallazgos de laboratorio y los resultados de pruebas específicas, incluyendo las posibles reacciones serológicas cruzadas. La técnica de PCR, aunque más costosa, podría confirmar la infección en los casos donde la serología resulta insuficiente.

Bibliografía

- Aguirre E, Ayllón T, Sainz A, Amusategui I, Villaescusa A, Rodríguez-Franco F, Tesouro M. Results from an indirect fluorescent antibody test using three different strains of *Ehrlichia canis*. Vet J. 182:301–5, 2009.
- Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. Biometrics. 33:159-74, 1977.
- Little SE. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. Vet Clin Small Anim. 40:1121–40, 2010.

PC2- VARIACIONES HEMATOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS EN PERROS CON HEPATOZOONOSIS

S. Rossi [1]; G. Casasnovas [3]; F. Casasnovas [3]; M. Fiorimanti [2]; C. Maffrand [3]
[1]: Departamento de Clínica Animal, UNRC. [2] :Becaria Doctoral CONICET, FAV,UNRC. [3]: Laboratorios Maffrand.
sofairossicolombo@hotmail.com

Introducción

La hepatozoonosis canina es una enfermedad producida por *Hepatozoon spp*. El ciclo evolutivo se inicia cuando el perro ingiere una garrapata del género *Rhipicephalus sanguinius* contaminada con ooquistes de *Hepatozoon*. En Argentina se ha caracterizado a *Hepatozoon canis* por estudios morfológicos y moleculares[3]. La infección puede ser asintomática o expresarse como una enfermedad severa, potencialmente mortal. El cuadro clínico más frecuente cursa con hipertermia, anorexia, abatimiento, anemia, hiperestesia y dificultad en la marcha. Los hallazgos radiográficos son inconstantes con proliferación perióstica de intensidad variable[4]. Objetivo: evaluar las variaciones hematológinas y bioquímicas en caninos infectados con Hepatozoon canis.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo en 82 caninos que presentaron gamontes de Hepatozoon en los leucocitos, ingresados al servicio diagnóstico de un laboratorio de Río Cuarto, Córdoba. Se analizaron 82 hemogramas con un contador hematológico automático (Mindray Bio-Medical Electronics Co., BC-2800, China). Los extendidos sanguíneos, coloreados con May Grünwald-Giemsa, fueron observados por microscopía óptica a 400 y 1000 aumentos. Se analizaron datos de alanina amino transferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA), urea y creatinina (CT), procesados por métodos de uso comercial (Wiener Lab®), en un analizador automático Wiener Lab CM 250, Argentina. Mediante el software InfoStat se usó la Prueba de Chi Cuadrado Pearson para evaluar la dependencia de las variables estudiadas respecto del grado de parasitemia.

Resultados

El porcentaje de leucocitos con gamontes, varió del 1 al 80%. El 18,3% (n: 15) de los animales fue clasificado con parasitemia elevada (mayor a 800 gamontes/µl[1]). El 42,6% cursó con anemias, clasificadas como: leves (14,6%) (n: 12), moderadas (13,4%) (n: 11) y marcadas (14,6%) (n: 12). Las anemias se caracterizaron por ser normocíticas normocrómicas (31,4%) (n: 11), normocíticas hipocrómicas (45,7%) (n: 16), normocíticas hipercrómicas (11,4%) (n: 4) y microcíticas hipocrómicas (11,4%) (n: 4). Si consideramos solamente a los animales con parasitemia elevada, el 86,6% presentó anemia, encontrándose que existe una relación entre el nivel de parasitemia y la presencia de anemia (*P ≤0.05*); siendo el 40% anemias marcadas con hematocritos menores a 20. Respecto a los leucocitos, se observó: leucopenia (4,9%) (n: 4), leucocitosis moderada (23,2%) (n: 19), leucocitosis marcada (7,3%) (n: 6) y leucocitosis extrema (1,2%) (n: 1). El 34,1% (n: 28) presentó neutrofilias y el 11% (n: 9) neutropenias. Respecto a la presentación de desvíos a la izquierda (DI), el 35,4% (n: 29) tuvo DI regenerativos y el 2,4% (n: 2) DI degenerativos. El 28% (n: 23) presentó linfopenias, el 32,9% (n: 27) monocitosis y el 6,1% (n: 5) monocitopenia. Los caninos presentaron: eosinofilia (20,7%) (n: 17) y eosinopenia (22%) (n: 18). El 22,0% (n: 18) presentó trombocitopenias. Las variaciones hematológicas observadas, variaron cuando se consideró la carga parasitaria (Tabla 1). Se encontró, que el grado de parasitemia, está asociado a la presencia de leucocitosis (*P ≤0.05*) y neutrofilia (*P ≤0.05*), y no existe relación entre el nivel de parasitemia y el valor de eosinofilos, siendo variables independientes (*P ≥0.05*). Los resultados de la química sanguínea se muestran en la Tabla 2. El 58,5% (n: 48) presentó hiperproteinemia y el 10,9% (n: 9) hiperfibrinogenemia. Los altamente parasitados presentaron hiperproteinemias en un 73,3% e incrementos en: urea (27,3%), ALT y AST (20%), y FA (60%). El grupo de baja parasitemia cursó con aumento de urea (39,2%), creatinina (23,2%), ALT (28,8%), AST (22,2%) y FA (43,9%). La mayor diferencia se observó en los valores de FA, sin embargo no hubo correlación entre estas variables (*P ≥0.05*).

	A (%)	L (%)	N (%)	DI (%)	L (%)	M (%)	Ef (%)	Ep (%)	Pq (%)
PA	86,7	66,6	66,6	80	33,3	46,7	13,3	26,6	85,7
PB	32,7	23,1	23,9	28,4	26,9	28,3	22,4	21,0	31,8

Tabla 1. Porcentaje de animales con anemia (A), leucocitosis (L), neutrofilia (N), desvíos a la izquierda regenerativos (DI), monocitosis (M), eosinofilia (Ef), eosinopenia (Ep) y trombocitopenias (Pq) en animales con parasitemia alta (PA) y parasitemia baja (PB).

Bioquímica	(n)	Prom	Max	Min	DS	CV
Urea (mg/dl)	64	69,9	398,0	11,5	66,9	0,96
CT (mg/dl)	64	1,57	12,5	0,3	1,74	1,11
ALT (UI/L)	62	98,0	1376,0	3,7	206,4	2,1
AST (UI/L)	55	57,7	582,4	12,6	79,9	1,4
FA (UI/L)	51	533,4	5683,0	23,4	1048,5	1,97

Tabla 2. Determinaciones de Urea, CT, ALT, AST y FA con el número de animales (n), promedio (Prom), valores máximos (Max) y mínimos (Min), desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV).

Discusión y conclusión

Coincidiendo con lo descripto por otros autores, la anemia es una presentación frecuente en perros con Hepatozoonosis y por su clasificación morfológica es arregenerativa o pobremente regenerativa, sin observarse macrocitosis e hipocromía característico de los procesos regenerativos; siendo el cuadro leucocitario de mayor presentación la leucocitosis, con neutrofilia con desvío a la izquierda y linfopenia y en relación a los megacariocitos, es frecuente la trombocitopenia. Algunos autores, ponen en duda estos cambios, asignandoles escaso valor diagnóstico debido a enfermedades concomitantes que puedan enmascarar la respuesta. Sin embargo, en este estudio se demuestra que estas modificaciones hematológicas se relacionan directamente con el grado de parasitemia de *Hepatozoon canis*. La eosinofilia no se puede tomar como una tendencia ya que un porcentaje similar de perros expresó eosinopenias. La respuesta hematológica es característica de procesos crónicos, inflamatorios, infecciosos, la eosinofilia se relacionaría al cuadro parasitario y la eosinopenia a stress sistémico. La trombocitopenia es consecuencia de una alteración en la trombopoyesis. Las azotemias observadas corresponderían más a patologías concomitantes que a efectos directos del parásito; si bien está descripto el daño glomerular, en este estudio no hubo en los animales infectados con alta carga de parasitemia, incrementos en los valores de CT, por lo que los aumentos de urea en este grupo podrían ser de origen prerenal. El dato bioquímico más relevante en los animales con *Hepatozoon*, es el incremento de FA (aunque no exista asociación estadística entre éste parámetro y el grado de parasitemia), lo cual podría relacionarse con la proliferación perióstica de intensidad variable que produce el *Hepatozoon*.

Bibliografía

-Baneth, G.; Weigler, B. (1997).Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. J Vet Intern Med. Nov-Dec; 11(6):365-70.

-Eiras, D.; Basabe, J.; Scodellaro, C.; Banach, D.; Matos, M.; Krimer, A.; Baneth, G. (2007). First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. Veterinary Parasitology. 149(3-4):275-9.

-Esarte, M.; Negro, V.; Oribe, G.; González, A.; Pérez, M. (2010). Lesión osteolítica asociada a Hepatozoon canis en un perro.X Congreso Nacional de AVEACA- Congreso del Bicentenario.Bs As.

PC3- MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO

C. Maffrand[(1)]; A. Benzoni[(1)]; G. Morilla [(1)]; S. Babini [(1)]; S. Rossi [(1)]; M. Fiorimanti [(2)]; A. Cristofolini [(2)]; C. Merkis[(2)].
[(1):] Departamento de Clínica Animal. [(2):] Área Microscopía Electrónica. FAV. UNRC.
cmaffrand@ayv.unrc.edu.ar

Introducción

Entre los tumores frecuentes en los caninos, se encuentra el denominado Tumor Venéreo Transmisible (TVT). Los marcadores tumorales se utilizan en la caracterización de las neoplasias y en la clasificación de su malignidad y pronóstico. Entre los marcadores de proliferación celular encontramos al Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) y al antígeno Ki67. El PCNA se lo relaciona con proteínas comprometidas en la replicación del ADN, favoreciendo su síntesis; también interactúa en distintos caminos metabólicos involucrados en la reparación del ADN. Además hay mecanismos específicos de control que se activan para detener la progresión del ciclo celular en caso de problemas, donde el PCNA forma complejos con proteínas que inhiben la replicación del ADN. La desventaja de este marcador es el tiempo de vida útil prolongado de la proteína después de la salida de la célula del ciclo celular (Gupta y Sood, 2012). Por otro lado, Ki67, es una proteína nuclear y nucleolar estrechamente ligada a la proliferación de células somaticas. Se expresa durante la fase activa del ciclo celular y está ausente en las células en reposo proporcionando una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido (Bassani Silva, 2008).

El objetivo de este trabajo fué determinar el valor pronóstico de factores relacionados con la manifestación del TVT en etapa progresiva y regresiva del tumor, mediante el uso de los marcadores de proliferación celular PCNA y Ki67.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio en 12 caninos con diagnóstico clínico de TVT que ingresaron al Hospital de Clínica Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Se tomaron muestras biopsias del tumor, durante la etapa progresiva y en la fase regresiva, inducida por el tratamiento de sulfato de vincristina, vía endovenosa, con dosis de 0,025 mg/Kg cada 7 días hasta la remisión total del tumor. Se realizaron cortes histológicos de ± 4-5 µm, los cuales fueron destinados para la inmunolocalización de PCNA y Ki67, a través de técnicas inmunohistoquímicas, utilizando anticuerpos comerciales (DakoCytomation, Denmark Santa Cruz Biotechnology Inc., USA; respectivamente). Para cada una de las moléculas se realizó una relación entre células marcadas y células totales, obteniéndose un porcentaje de marcación. Las observaciones se realizaron a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania), adquiriendo las imágenes mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japon). Los datos obtenidos fueron sujetos a un análisis estadístico con el software InfoStat usando un test *a posteriori* LSD-Fisher para detectar las diferencias estadísticamente significativas.

Resultados

Los resultados de inmunomarcación de PCNA mostraron una fuerte intensidad, expresado con una coloración amarronada en el núcleo de las células tumorales. Los porcentajes de marcación para PCNA en los pacientes con TVT en la etapa progresiva del tumor variaron entre 23,5% y 69,3%, con un promedio de 50,5% ± 15,8% y un C.V. de 31%. En los pacientes con TVT, 7 días después de haber iniciado el tratamiento (etapa regresiva inducida por la vincristina) fué de 0% a 93,4%, con un promedio de 55,2% ± 25,4% y un C.V. de 46%. En la etapa regresiva del tumor la tendencia fue un incremento en la inmunomarcación de PCNA. Sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p \geq 0.1818$). (Figura 1). La inmunomarcación para Ki67 previo al tratamiento, fue positiva en 9 caninos y negativa en 3 casos. No se observó diferencia de intensidad en relación al estadío del tumor. Los porcentajes de inmunomarcación para Ki67 en los caninos previo al tratamiento fueron de 0,2% a 2,7%, con un promedio de 0,81%, ± 0,90% y un C.V. de 110% y 6 caninos, luego del tratamiento presentaron un porcentaje de 0,2 a 3,6% con un promedio de 0,87% ± 1,2% y un C.V. de 138%. En el 66,7% de los animales se detectó un promedio mayor de marcación para Ki67 en la etapa progresiva del tumor (Figura 2)

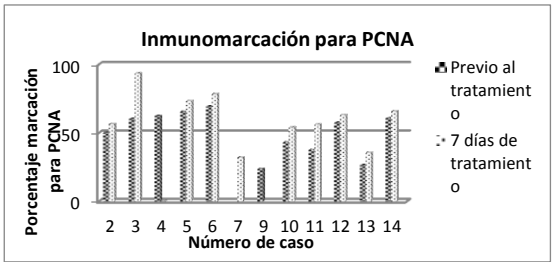


Figura 1. Porcentaje de inmunomarcación para PCNA en 12 casos de TVT previo al tratamiento y una semana posterior al inicio del mismo.

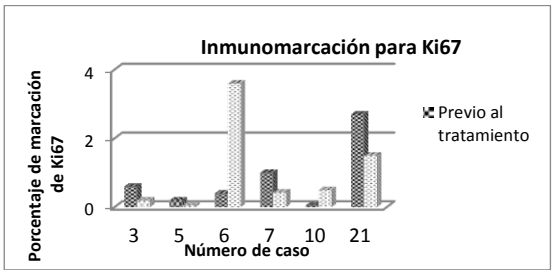


Figura 2. Porcentaje de inmunomarcación para Ki-67 en 6 casos de TVT previo al tratamiento y una semana posterior al inicio del mismo.

Discusión y conclusión

La elevada marcación para PCNA y la variabilidad en los resultados, podría deberse a su larga vida media (20 h) que podría sobreestimar el índice de proliferación de la neoplasia. PCNA inmunomarcaría células que han dejado recientemente el ciclo celular y en las cuales aún se podría detectar PCNA no degradado. Si bien este marcador juega un rol fundamental en la replicación del ADN, también está involucrado en los mecanismos de reparación del ADN y en menor grado, en generar señales negativas para la detención de la progresión del ciclo celular, estos dos últimos procesos podrían estar activos en la fase regresiva del tumor, lo cual justificaría los porcentajes obtenidos posterior al inicio del tratamiento. En el 66,7% de los animales tratados, se encontró un promedio de Ki67 inferior en los tumores en fase de crecimiento, en relación a la etapa regresiva del tumor. Sin embargo, el número de células marcadas en la fase regresiva inducida por el tratamiento, a los 7 días, fue menor, sugiriendo que en esta etapa del crecimiento tumoral, la actividad de proliferación celular está disminuida. Este marcador es capaz de distinguir en algunos animales, la fase de crecimiento progresivo y regresivo del TVT. El uso de este marcador de proliferación celular en muestras citológicas abriría la posibilidad de obtener diagnósticos más rápidos y realizar el seguimiento del tumor.

Bibliografía

-Bassani Silva, S. (2008). Imunoexpressão e citogenética do tumor venéreo transmissível natural no cão. (Tesis doctoral). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Botucatu.

-Gupta, K, Sood, N. (2012). Pathological and immunohistochemical studies on rare cases of primary extra-genital transmissible venereal tumours in the mammary gland. Vet. Med. Czech.: 57 (4): 198–2

PC4- UTILIDAD DEL ESTUDIO DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) EN EL DIAGNÓSTICO DE DISTINTAS PATOLOGÍAS DEL SNC EN BOVINOS: DESCRIPCIÓN DE CASOS

M. Allassia[1]; E. Angeli[1]; S. Machado[1]; R. Zimmermann[2]; F. Aguirre[2]; M. Ruiz[2]; E. Valler[2]; P. Elz[2]; N. Russi[3]; E. Cabañas[3].
[1] Práctica Hospitalaria de Grandes Animales. [2] Laboratorio de Análisis Clínicos. [3] Laboratorio de Bacteriología
Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional del Litoral
mallassia@fcv.unl.edu.ar

Introducción

El líquido cefalorraquídeo (LCR) es un fluido fisiológico que protege y brinda nutrición al sistema nervioso central (SNC). Se produce por ultrafiltración del plasma sanguíneo en los plexos coroideos de los ventrículos cerebrales. Es una solución acuosa (99%) compuesta por iones, sustancias neuroendocrinas, neurotransmisores, nutrientes y metabolitos tóxicos producidos por el tejido cerebral, transportándolos a la sangre. Se caracteriza por su bajo contenido de proteínas y células. Posee una cantidad de sodio similar al plasma, mayor cantidad de magnesio y cloruros, pero es pobre en potasio y bicarbonato. Las alteraciones en su composición dependen más de la localización y extensión de la lesión que de las características histológicas de las mismas. Las afecciones meníngeas tienen mayor incidencia sobre la composición del LCR que las lesiones parenquimatosas. La obtención y evaluación del LCR, es un método complementario del examen clínico, útil para la aproximación diagnóstica de cuadros neurológicos sospechosos de etiología infecciosa, neoplásica, inflamatoria, carencial. El presente trabajo pretende describir la importancia que tuvo la obtención y posterior análisis del LCR en el diagnóstico de distintos cuadros patológicos con predominio de signos nerviosos de origen central.

Materiales y métodos

- **Caso 1:** Hembra, de 18 meses de edad, Holstein, proveniente de un establecimiento lechero en saneamiento. Motivo de la consulta: en 10 meses 6° animal de 150 en la recría presentaron signología nerviosa: deambular en círculos, incoordinación, opistótono, debilidad, decúbito prolongado y muerte. A estos animales se les realizó la necropsia y se obtuvo LCR para ser enviado al laboratorio de análisis clínicos (LAC). Se realizaron improntas y se obtuvieron muestras en formol buferado al 10% las que fueron enviadas para estudios histopatológicos.
- **Caso 2:** Hembra, Hereford, de 12 meses de edad. Motivo de la consulta: depresión, deambulación en círculos, parálisis flácida de lengua, y del labio inferior, excesiva salivación. El animal pertenecía a un feed lot de 1000 animales, con 6 animales más con igual signología. La ración *ad libitum* compuesta por silo de maíz, heno de alfalfa, avena, expeller de soja, grano de maíz y sorgo. Se remitieron muestras con y sin anticoagulante de sangre y LCR al LAC y una muestra estéril para estudios bacteriológicos.
- **Caso 3:** Fueron afectados 3 machos castrados, cruzas, de 6 a 8 meses de edad aproximadamente, a campo, de un total de 145 animales. Se evidenció depresión marcada del sensorio, con indiferencia al medio, ceguera e hipertermia. Se realizó la necropsia de uno de ellos y se obtuvo LCR para ser analizado y muestras en formol al 10%.
- **Otros casos:** En este punto se agruparon diferentes casos con signología nerviosa variable, siempre de origen encefálico, afectando desde un solo individuo hasta 34 animales, en sistemas de producción intensiva. En todos se realizó extracción del LCR. En un caso se realizó necropsia con envío de muestras al laboratorio de histopatología; en otro se extrajo materia fecal para remitir al laboratorio de parasitología; en un tercer caso se remitió suero sanguíneo a un laboratorio más especializado.

Resultados

- **Caso 1:** El análisis del LCR, de aspecto turbio, demostró un exceso de proteínas (444 mg/dl; Pandy +++), pleocitosis (1175/mm^3), con predominio de mononucleares, observándose mediante la tinción Ziehl Neelsen (ZN) bacilos ácido alcohol resistente. A la necropsia se observaron adherencias pleurales y granulomas en pulmón de diferentes tamaños de color blanco-amarillento. Lesiones similares se evidenciaron en diferentes nódulos linfáticos presentando, incluso, "arenilla" al corte. El sistema nervioso central presentaba meninges muy engrosadas, con pequeños y numerosos granulomas que penetraban en la masa encefálica, detectándose "arenilla" al corte. A nivel histopatológico se observó meningoencefalitis granulomatosa multifocal con necrosis caseosa y calcificación; meninges con extensos granulomas con proliferación de tejido epitelioide y numerosas células gigantes de Langhans. Con la tinción de ZN, se observaron bacilos ácido alcohol resistente en la mayoría de los granulomas y en las improntas remitidas. Estos resultados son compatibles con *Micobacterium bovis*.
- **Caso 2:** El hemograma demostró leucocitosis neutrofílica y monocitosis, el LCR evidenció pleocitosis neutrofílica, observándose en algunos monocitos microorganismos bacilares pequeños intracelulares. En el cultivo del LCR en agar sangre con un 10% de CO_2, incubadas a 37°C por 48 hs. desarrollaron colonias aisladas, traslúcidas, de bacilos Gram (+) que por reacciones bioquímicas tradicionales se llegó a la conclusión de que se trataba de *Listeria monocitogenes*.
- **Caso 3:** El LCR presentaba leve turbidez, mostró pleocitosis (240/mm^3), con predominio de mononucleares y proteínas aumentadas. A la necropsia se evidenció una hiperemia leve en encéfalo. La histopatología mostró una meningoencefalitis no supurativa (mononuclear) observándose, cuerpos de inclusión compatible con una acción viral, orientando el diagnóstico a IBR nervioso (herpesvirus).
- **Otros casos:** En estos casos no se encontraron en el LCR alteraciones importantes y orientadoras de una causa específica. En uno de ellos, la lesión histopatológica encontrada, polioencefalomalacia, fue orientadora del diagnóstico presuntivo Carencia de Vitamina B. En otro caso se realizó, al único animal del lote afectado (1/16), análisis coproparasitológico encontrando altos conteos de opg (6.500, 17.260 y 24.240) en 3 días sucesivos; las especies identificadas fueron *E. bovis* y *E. zuernii*. En la necropsia solo se encontraron lesiones microscópicas importantes en intestino y no en cerebro (trastorno funcional del SNC). Por inoculación del suero animal en ratones con replicación de los signos se presume el diagnóstico de coccidiosis nerviosa. En el caso que contó con 34 animales afectados se envió el suero de 7 animales afectados al LAC para evaluar niveles de vitamina A encontrando niveles por debajo de lo normal.

Discusión y conclusión: Si bien los resultados del análisis físico, químico y citológico del LCR no son diagnósticos por sí solos, son de mucha ayuda en aquellos casos donde predominan signos nerviosos de origen central. En algunas oportunidades permite al clínico de campo en forma rápida, poder diferenciar entre trastornos nerviosos de tipo funcional (hipomagnesemia, tétano, hiperamoniemia, coccidiosis nerviosa) y trastornos orgánicos del SNC (IBR nervioso, listeriosis, tuberculosis meníngea, meningoencefalitis por *Histophilus somni*). Aunque para tener un diagnóstico final se deba derivar esta muestra a otros laboratorios como por ejemplo de microbiologia, micología.

Bibliografía:

Latimer, K.; Mahaffey, E.; Prasse, K. 2005.Patología clínica veterinaria. 4° Edición. Editorial Multimédica Ediciones Veterinarias

Odriozola, E. 2013. Enfermedades de los bovinos con signos nerviosos. INTA Balcarce. Argentina.

PC5- PARATUBERCULOSIS BOVINA: ASOCIACIÓN ENTRE EL ÍNDICE UREA Y LA DENSIDAD ÓPTICA DE LOS SUEROS EN LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO.

LA. Di Paolo[1], PS. Sosa[2], MF. Alvarado Pinedo[1], LM. Peralta[1], MA. Romero[3], GE. Travería[1]
[1] CEDIVE. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP. Alvear y Salta (7139). Chascomús. Buenos Aires.
[2] Becario de la Universidad Nacional de La Plata. [3] Becaria de la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC). Email: ladipaolofcv@gmail.com

Introducción. La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad consuntiva crónica de los rumiantes. Los bovinos se infectan desde terneros, cuando ingieren el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). El período de incubación es extremadamente largo (entre 2 y 8 años), y culmina cuando se observa pérdida de peso, edema submandibular y diarrea profusa incoercible, que generalmente lleva a la muerte. Los estadios asintomáticos (subclínicos) pueden durar varios años, y son un verdadero desafío desde el punto de vista del diagnóstico. Este se puede realizar a partir del cultivo bacteriológico de muestras de materia fecal (MF), intestino, linfonodos, etc. Las colonias son visibles a partir de las 6 semanas y el dar negativa la muestra demanda hasta 6 meses. Las pruebas serológicas como la inmunodifusión en gel de agar (AGID) y la prueba de ELISA se utilizan regularmente como métodos serológicos indirectos complementarios al cultivo. El ELISA presenta una buena sensibilidad cuando se utiliza en rodeos endémicos, pero en algunos casos la especificidad puede verse afectada por la presencia de anticuerpos inespecíficos o de baja avidez en el suero. La urea afecta los enlaces de hidrógeno desestabilizando las fuerzas hidrófobas que actúan en la unión antígeno-anticuerpo, las uniones débiles se desprenden, quedando unidas las que tienen mayor afinidad funcional (avidez). Esta se incrementa con el tiempo después del contacto inicial con el patógeno, y se relaciona con la cronicidad de la infección. El objetivo de este trabajo fue correlacionar el índice urea (IU) con la densidad óptica (DO) en la prueba de Elisa.

Materiales y métodos. Se trabajó con 592 muestras de suero provenientes de tres establecimientos ganaderos comerciales, dos de cría (Est. A y Est. B) y un tambo (Est. C). Los rodeos A y B se sangraron en su totalidad, mientras que en el C las muestras fueron de una fracción de las vacas en ordeñe. A los animales positivos a ELISA se les extrajo MF del recto para cultivo bacteriológico. Todos los sueros se sometieron al test de ELISA indirecto sembrados por duplicado, uno sin y otro con exposición a la urea, esta se utilizó a una concentración de 8 M, durante 4 minutos antes de agregar el conjugado y continuar con el protocolo de la prueba. Se utilizó antígeno de *M. avium* subsp. *avium* lisado a 40 kpsi en un disruptor celular. Al realizar la lectura de las DO se calculó el IU de cada muestra con la siguiente fórmula: Índice urea= (DO suero con urea /DO suero sin urea) x 100.Con los resultados obtenidos se realizó, en primera instancia, la cuantificación de la seroprevalencia, luego una regresión lineal para establecer la correlación entre el IU y la DO, y finalmente se realizó un test de anova simple (Statgraphics®) comparando los grupos positivos y negativos en base al valor de DO del ELISA urea, con el objetivo de hallar diferencias significativas en relación a los IU entre ambos. Las muestras de MF se sembraron en medio de cultivo líquido para micobacterias (Romero y col, 2018. https://revistas.unlp.edu.ar/analecta)

Resultados. Las seroprevalencias determinadas fueron del 3,2 % para el Est. A (n=214), 3,4 % para el Est. B (n=287) y 16,4 % para el Est. C (n=91). El coeficiente de correlación entre las variables IU y DO fue de 0,76 (R-cuadrada = 58,5 %), 0,14 (R-cuadrada = 1,96 %) y 0,70 (R-cuadrada = 50,02 %) respectivamente para los tres establecimientos. El análisis de varianza para detectar diferencias entre grupos positivo y negativo, con una p<0,05 (p=0,0001) mostró diferencias estadísticamente significativas para los tres establecimientos analizados. Posteriormente se hizo una prueba post-hoc (LSD de Fisher) observándose que en todos los casos el grupo positivo presentó el índice urea más elevado que el negativo. Ver figuras correspondientes al Est. A. Los cultivos de MF procesados hasta el momento fueron positivos a PTB en el 21,8 % de las muestras.

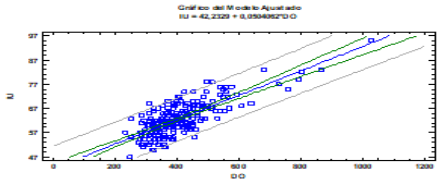


Figura 1: Gráfico de dispersión, donde se observa la correlación existente entre la DO y el IU en la prueba de ELISA.

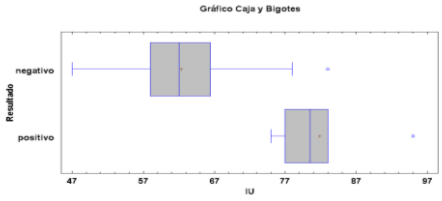


Figura 2: Gráfico de caja y bigotes donde se observan las diferencias en los valores de índice urea entre los grupos positivo y negativo. La prueba de Múltiple Rangos (LSD) de Fisher determinó que el grupo positivo se diferenció del negativo, con una p=0,0001.

Discusión y conclusión. Las seroprevalencias halladas están en concordancia con las observadas por otros autores (Alvarado Pinedo y col, 2018) en la región, siendo mayor en el establecimiento tambero que en los de cría. La asociación entre las variables IU y DO mostró una correlación positiva alta en los Est. A y C; mientras que en el Est. B la asociación fue positiva muy baja. En los tres casos se hallaron diferencias significativas (p=0,0001) entre los grupos positivo y negativo. El IU podría utilizarse, a futuro, como indicador de especificidad de los sueros para PTB en los rodeos endémicos para así focalizar el seguimiento de los animales que muestren sueros con alta avidez. Los animales diagnosticados positivos al ELISA urea y con IU alto podrían ser infectados crónicos, próximos a manifestar signos clínicos; mientras que, los animales negativos al ELISA urea, pero con IU alto podrían ser futuros enfermos, debido a que ya poseen anticuerpos con alta avidez. La identificación y el seguimiento de ambos grupos podría tener implicancias sanitarias importantes en el control de la PTB.

Bibliografía.

1-Alvarado Pinedo MF, Sosa P, Di Paolo LA, Romero M, Peralta LM, Travería GE, Moyano D, Jaureguiberry M, Romano M. ELISA urea in the diagnosis of paratuberculosis: estimation of seroprevalence in some localities of Buenos Aires province, Argentina. 14th International Colloquium on Paratuberculosis. 4-8 June 2018. Rivera Maya México. Abstracts programme ICP 2018. Page 72.
2-Lau L, Green AM, Balmaseda A, Harris E Antibody avidity following secondary dengue virus type 2 infection across a range of disease severity. J Clin Virol. 2015 Aug;69:63-7.
3-Nagao-Dias AT, Almeida TL, Oliveira Mde F, Santos RC, Lima AL, Brasil M.. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure Braz J Infect Dis. 2007 Apr;11(2):215-9.

PC6- LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA ASOCIADA A UN CUADRO DE PIODERMIA PROFUNDA: DESCRIPCIÓN DE UN CASO CLÍNICO

R. Pretti[1,2,3]; L. Fontana[1-2]; G. Di Federico[1-4]; C. Savignone[2,5]; M. Arauz[2]
1.-Actividad privada; 2.-Servicio Central de Laboratorio del Hospital Escuela, 3.-Cátedra de Patología Especial; 4.-Servicio de Cirugía y Anestesiología del Hospital Escuela y 5.-Cátedra de Bioquímica.Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
rominapretti@hotmail.com

Introducción

La leucemia mieloide crónica (LMC) en caninos, se produce por la proliferación mieloide de la serie granulocítica con persistencia de la capacidad de maduración que normalmente evoluciona a la línea neutrofílica (1). Se caracteriza por presentar signos clínicos inespecíficos como hipertermia, claudicaciones intermitentes, pérdida de peso. Al examen físico, esplenomegalia y en los resultados del hemograma puede observarse: anemia, trombocitopenia y recuentos leucocitarios variables (no siempre cursan con leucocitosis) o sin particularidad alguna (2).

En Argentina, son pocos los métodos complementarios utilizados de rutina en medicina veterinaria para el diagnóstico de la LMC, en relación a los empleados en medicina humana (citogenética, citometría de flujo, etc.). Si bien la LMC es muy poco frecuente en caninos, representando menos del 10% de las neoplasias hematopoyéticas (2), está mal caracterizada, por lo que su diagnóstico resulta un desafío. Los resultados obtenidos por punción medular, muestran una médula hipercelular con marcada hiperplasia mieloide en la que se respeta la pirámide de maduración. Por lo tanto, el medulograma por sí solo, no nos permite el diagnóstico, pues únicamente informa de una intensa proliferación mieloide en todos los estadios de maduración.

La fosfatasa alcalina leucocitaria (FAL) habitualmente se utiliza en caninos, para distinguir la LMC de otras leucocitosis reactivas (reacción leucemoide) (5), aunque existen opiniones encontradas, debido a que algunos autores, consideran que la actividad de esta enzima en los granulocitos de esta especie no son constantes tanto en células normales como anormales (4). La actividad en los neutrófilos de la Fosfatasa Alcalina se ha informado en la LMC en caninos, pero también se ha demostrado una translocación homóloga a la encontrada en humanos, en caninos con LMC espontánea (3). Por lo tanto, el diagnóstico se debe realizar en base a los signos clínicos, resultados de hemograma, punción medular y tinción citoquímica de FAL.

Descripción del caso

Se presenta en un consultorio privado de Oncohematología, un paciente canino macho entero de raza Cocker de 7 años de edad, derivado por un médico veterinario clínico. Anamnesis remota: presentaba alopecia simétrica con piodermia profunda de cuatro meses de evolución con pobre resultado al tratamiento médico instaurado; con estudios previos hormonales para descartar Cushing e Hipotiroidismo, dando valores de hormonas tiroideas compatibles con diagnóstico de Hipotiroidismo. Al momento de la derivación presentaba un cuadro de trombocitopenia de 39.000 plaquetas/mm^3 (VN 120.000 a 500.000 plaquetas/mm^3), y el resto de los resultados hematológicos y bioquímicos estaban dentro de los parámetros normales. Se le había realizado también serología de Ehrlichia, la cual había dado no reactiva.

En la interconsulta, se le realizó un examen físico donde se observó a nivel de la piel: alopecia simétrica, liquenificación, áreas costrosas en región de dorso y lomo, manto untuoso, olor rancio, pododermatitis severa en los cuatro miembros. Decaimiento marcado, sin fiebre y sin esplenomegalia a la palpación.

Debido a la trombocitopenia se procedió a efectuar la maniobra de punción medular, dando como resultado el medulograma, hiperplasia mieloide; a continuación, se realizó la tinción citoquímica (FAL) dando positiva. Este resultado se consideró compatible con LMC.

Una vez establecido el diagnóstico se comienza con el tratamiento médico: un antiácido, omeprazol 1mg/kg cada 24hs, meprednisona 2mg/kg cada 24 hs a dosis decreciente, un inmunomodulador (Paulferon) 1ml/10Kg, por día e hidroxiurea, 50mg/kg cada 24hs. Al mes de iniciado el mismo, se observó en estudios hematológicos realizados, una normalización del valor plaquetario siendo el mismo de 270.000/mm^3 y a su vez una mejoría clínica en la piel, la cual solo se manejó con un shampoo antiseborreico y un antipruriginoso Oclacitinib (Apoquel) 0,4-0.6mg/kg de peso..

Transcurrido el año de iniciado el tratamiento, sólo se mantiene una dosis de hidroxiurea 50mg/kg de peso, semanalmente, permaneciendo las plaquetas en un valor de 240.000/mm^3, con la recuperación total de sus lesiones de piel (manto piloso abundante y con brillo).

Discusión y conclusiones

En todo paciente con problemas dermatológicos crónicos sin respuesta adecuada al tratamiento y con presencia de alteración hematológica (anemia, leucocitosis, leucopenia y/o trombocitopenia) se recomienda realizar la punción medular en la búsqueda de un desorden mieloproliferativo para instaurar un tratamiento adecuado y evitar una crisis blástica.

Bibliografía

1-Fabián, A., Carmen, M., & Gascón, M. (2001). Las alteraciones de la médula ósea en el perro y el gato. *Clínica veterinaria de pequeños animales*, *21*(3), 0232-249.

2-Nelson, R. W., & Couto, C. G. (2005). Medicina interna de animales pequeños. Editorial Intermédica. Buenos Aires.

3-Pereira, M. E., Fidanza, M. M., Mantica, F., González, S., Gabriele, C., & Mira, G. A. (2012) Leucemia mieloide crónica en pacientes caninos: rasgos epidemiológicos y aproximación diagnóstica. *Vet. Arg. Vol. XXIX. 295.*

4-Raskin R. (1996) Myelopoiesis and myeloproliferative disorders. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 26(5), 1023-1042.

5-Stokol, T., Schaefer, D. M., Shuman, M., Belcher, N., & Dong, L. (2015). Alkaline phosphatase is a useful cytochemical marker for the diagnosis of acute myelomonocytic and monocytic leukemia in the dog. Veterinary clinical pathology, 44(1), 79-93.

PC7- ESTUDIO DEL PERFIL PROTEICO EN PACIENTES CANINOS CON SIGNOLOGÍA DE LESIÓN RENAL

G. Miceli[(1)], P, DiCunzolo, [(2),] E, Bonzo[(3)]yE. Mortola[(1)]
[(1)]Cátedra de Inmunología Veterinaria Aplicada, [(2)]Alumna de la Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio,
[(3)]Cátedra de Epidemiologia. Facultad de Cs. Veterinarias de UNLP; Calle 60 y 118. 1900 – La Plata.
ebonzo@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

La electroforesis es una prueba de laboratorio clínico, empleada para separar proteínas séricas por tamaño y carga eléctrica, permitiendo la identificación y cuantificación de sus diferentes fracciones. Aunque la electroforesis proteica tiene una baja especificidad en el diagnóstico, cuando los tejidos responsables de la síntesis o excreción de proteínas son alterados por alguna patología, en el suero del paciente aparecen patrones proteicos distintivos que son muy útiles en el diagnóstico clínico. Las modificaciones en la concentración de proteínas séricas totales, la distribución fraccionada de las proteínas sanguíneas y la relación albúmina/globulina suelen ser los primeros signos de anormalidad. Varios factores, incluidas las enfermedades infecciosas y parasitarias, pueden influir en la fluctuación de las proteínas séricas. La correlación entre el perfil de proteínas séricas y distintas enfermedades se han demostrado en seres humanos y animales domésticos. La interpretación de los resultados electroforéticos depende de la inspección visual para identificar patrones anormales o bandas aberrantes y de la cuantificación para calcular las cantidades relativas de las fracciones individuales. En las patologías renales, al existir un daño glomerular se manifiesta una alteración en la filtración glomerular. Cuando la sangre fluye a través del glomérulo, el grado con el que las proteínas plasmáticas son filtradas depende de su concentración en suero, tamaño molecular, forma y carga. Aunque el suero contiene concentraciones altas de albúmina, en el filtrado glomerular sólo aparecen pequeñas cantidades, ya que posee un peso molecular entre 66 y 69 kDa. El daño glomerular se caracteriza por pérdidas de las cargas negativas fijadas en los capilares del glomérulo. Estos cambios estructurales pueden producirse por procesos primarios como neoplasias, enfermedad autoinmunes de la membrana basal o inflamación, y secundarios como depósitos de inmunocomplejos, amiloidosis. Las dos causas más importantes de hipoproteinemias y proteinuria son amiloidosis renal y glomerulonefritis. La glomerulonefritis o la amiloidosis darán lugar a daño renal y si no se soluciona conduce a una falla renal y síndrome urémico. El objetivo del presente trabajo fue describir los valores de proteínas séricas en una población canina con lesiones de origen renal y compararlos con valores de referencia.

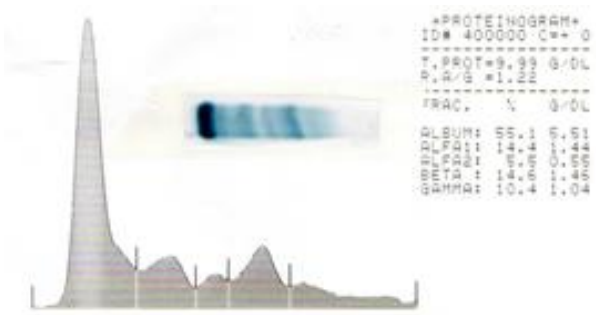
Materiales y métodos

Se utilizaron 55 muestras de suero provenientes de caninos con sospecha de leptospirosis y signología compatible con lesión renal (anorexia, decaimiento, vómitos, poliuria, polidipsia). Las muestras se recogieron durante el período enero de 2016 y junio de 2017. Para determinar las fracciones proteicas del suero, las muestras fueron analizadas, por electroforesis en tiras de acetato de celulosa (Cellogel®), con sembrador semimicroen buffer borato-acetato (Biopur® pH 8.6.I:0.06) y equipo de electroforesis Labnet®. Las tiras se colorearon con Amido Black 10B, luego de su decoloración y transparentización, las bandas se cuantificaron en un densitómetro (Mod CT450 - CITOCON®). La concentración total de proteínas se realizó empleando el kit comercial Proti2 (Lab. Wiener®).Las muestras fueron analizadas para el diagnóstico serológico de leptospirosis por la técnica de MAT.Se realizó un análisis exploratorio de los datos. Para los valores de referencia inferior y superior se establecieron los intervalos con un 95% de confianza.

Luego se realizó la comparación de los valores analizados con el valor de referencia utilizado por los autores (Kaneko), mediante la prueba de t de Student para una muestra. ($p<0,05$).

Resultados

En la especie canina se distinguen 5 fracciones: Albumina, α1; α2, β y γ globulinas. Se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre los resultados de las muestras de este estudio y los respectivos valores de referencia para las fracciones α1, β y γ.De los pacientes analizados el 53% presentó serología positiva a Leptospirosis en título ≥1/800 a diferentes serovares.



En la figura se observa la densitometría de un suero problema, tomado como ejemplo de las alteraciones en las fracciones proteicas.

Discusión y conclusiones

Normalmente, el patrón del síndrome nefrótico se caracteriza por una disminución de la albúmina, un aumento de las α-globulinas, y una disminución de las γ-globulinas, como consecuencia de las pérdidas renales de las proteínas de menor peso molecular y el aumento compensatorio de las de mayor peso molecular, como las α y β-globulinas. Asimismo, el incremento de las α-globulinas está a menudo asociado a un proceso inflamatorio. En nuestro estudio además del aumento de la fracción α-globulina observamos un aumento de la fracción γ-globulina, posiblemente debido a que más de la mitad de nuestros pacientes tenían un proceso infeccioso activo como la leptospirosis.

Bibliografía

-Kaneko, JJ, ed. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 4th ed. New York, NY: Academic Press; 1989
-Tappin,SW; Taylor,S:Tasker,S; et al. Serum protein electrophoresis in 147 dogs. Vet Rec. 2011. 168(17):456-460.
-Vavricka SR; BurriE;Beglinger C; et al. Serum protein electrophoresis: an underused but very useful test.Digestion. 2009; 79(4): 203-210.

PC8- RESULTADOS PRELIMINARES DE LA MEDICIÓN DE GASES EN SANGRE ARTERIAL DE CANINOS BAJO ENTRENAMIENTO AERÓBICO

[1, 2]M, Marchionni; [3, 4]F.J, Pellegrino; [5]O, Robledo; [6]L, Fontana; [6]C, Savignone; M.S, [6]Arauz; [1, 4]Y.A, Corrada.
[1]Laboratorio de Fisioterapia Veterinaria (LAFIVET), Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). [2]Becaria UNLP. [3]Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET), FCV, UNLP. [4]CONICET.[5]Servicio central de cirugía, área anestesiología, FCV, UNLP. [6]Servicio Central de Laboratorio, FCV, UNLP.
magdalenamarchionni@yahoo.com.ar

Introducción

La medición de gases en sangre arterial es de gran utilidad para la detección y corrección de alteraciones metabólicas en pacientes críticos (4). También permite evaluar la oxigenación de la sangre, siendo las muestras arteriales más acordes para ello (4). Los resultados de esta medición pueden reflejar cambios a nivel fisiológico o como consecuencia de enfermedades. En el caso de los caninos, se documentaron diferentes valores promedio en cachorros y adultos (3). La influencia genética también está descripta. En galgos españoles y Greyhound se registraron los mayores índices de oxigenación y de Hemoglobina (Hb) (2). Otros estudios han reportado variaciones como consecuencia inmediata del entrenamiento (1). El aporte de oxígeno a los tejidos depende de una adecuada cantidad total de oxígeno arterial (CaO_2) y del gasto cardíaco. La CaO_2 se calcula a partir de una fórmula en la que se considera la concentración de Hb, la saturación de oxígeno del paciente (SaO_2) y la presión arterial de oxígeno (PaO_2) junto con otras constantes (4). La interpretación de la SaO_2 debería ser siempre realizada en relación con la cantidad de Hb del paciente, ya que dos pacientes con igual saturación, pero con distintos valores de Hb tendrán distinta oxigenación de su sangre. El conocimiento y la obtención de mejores parámetros de oxigenación sanguínea podría ser de utilidad en potenciales donantes de sangre o en pacientes que padezcan afecciones que pudieran reducir su capacidad de oxigenación, y la implementación de una rutina de entrenamiento físico podría ser el vehículo para lograrlo. Dentro de la bibliografía encontrada no se hallaron estudios que comparen poblaciones de caninos bajo un estímulo de entrenamiento sostenido en el tiempo en relación a poblaciones sin dicho estímulo. En todos los casos las mediciones habían sido realizadas de forma inmediata al finalizar el entrenamiento, o pasadas las 3 h, lo que no refleja las posibles adaptaciones en el largo plazo. Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar las modificaciones en los parámetros de sangre arterial de animales sin previo entrenamiento y luego de un estímulo aeróbico de 8 semanas.

Materiales y métodos

Se incluyeron 3 caninos sanos (macho n=1, hembras n=2) de 2 a 8 años de edad y de 27 a 30 kg de peso. Se evaluó el estado de salud mediante un examen clínico completo, análisis sanguíneos de rutina y radiografías de tórax. Previo a comenzar el estudio se procedió a la adaptación de los caninos al uso de la cinta trotadora. Posteriormente, se comenzó con el programa de entrenamiento de 8 semanas de duración, con una frecuencia de 2 veces por semana. Cada sesión de entrenamiento consistió en 40 minutos a una velocidad constante de 10 km/h y con una pendiente de 7.5%. Previo a comenzar con el primer día de entrenamiento y luego de finalizado el plan completo se tomó una muestra de sangre arterial de cada uno de los animales bajo anestesia (Ketamina-Midazolam) de la arteria pedal dorsal. La muestra fue analizada en un sistema analizador de gases (Epoc). En la tarjeta de lectura se colocaron 92 microlitros de sangre arterial y se obtuvieron los siguientes valores: PaO_2, SaO_2 y Hemoglobina. A partir de esas determinaciones se calculó: CaO_2= (1.34xHbxSaO_2) + (0.003xPaO_2) Donde: 1.34= Capacidad de unión del oxígeno a la hemoglobina (mlO_2/gHb). 0.003 (mlO_2/mgHb/dl) = Solubilidad del oxígeno en el plasma. También se registró: Ph, Ph t (corregido por la temperatura), PCO_2 (presión arterial de CO_2), PCO_2 t (corregido por la temperatura), $CHCO_3$ (concentración de bicarbonato), BE ecf (exceso de bases extracelular), cTCO_2 (contenido de CO_2), LS (lactato), BE b (exceso de bases en sangre) y Hematocrito (Hto). Los datos se analizaron con el sistema estadístico SAS 9.0. Los valores se expresan como medias de mínimos cuadrados (LSM) ± error estándar de las medias (SEM). (P<0,05).

Resultados

Tabla 1: Parámetros pre inicio del período de entrenamiento (0), y a las 24 h de finalizada la 8va semana del protocolo (8).

	Semana		
	0	8	
	LSM	LSM	SEM
pH	7,42	7,34	0,01
pH (t)	7,40	7,33	0,01
pCO_2 (mmHg)	30,03	37,23	3,37
pCO_2 (t) (mmHg)	32,06	39,36	3,59
pO_2 (mmHg)	93,76	82,33	13,42
pO_2 (t) (mmHg)	102,17	89,30	14,26
$cHCO_3^-$ (mmol/L)	19,56	20,50	1,54
cSO_2 (%)	96,23	94,76	1,99
cTCO_2 (mmol/L)	20,43	21,66	1,64
CaO_2 (mg/dL)	15,85	16,15	0,99
LS (mmol/L)	0,88	0,94	0,36
BE (ecf) (mmol/L)	-4,80	-5,10	1,32
BE (b) (mmol/L)	-3,83	-4,60	1,03
Hto (%)	36,66	37,33	2,72
Hb (g/dl)	12,33	12,73	0,92

Discusión

Los resultados obtenidos permiten tener una visión de la dinámica de los parámetros estudiados luego de un estímulo de entrenamiento a largo plazo. La última medición realizada a las 24 h de finalizado el estímulo permite eliminar el efecto inmediato del ejercicio observado en los estudios mencionados. **Conclusión**

Considerando las mediciones de los parámetros en tiempo 0 y 8, no se observaron diferencias significativas. No obstante, consideramos necesario continuar los estudios incrementando el tiempo de entrenamiento y el número de animales.

**Los autores agradecen a la empresa Vital Can por proveer el alimento balanceado para la realización del presente trabajo.*

Bibliografia

1) Matwichuk CL, Taylor S, Shmon CL, Kass PH, Shelton GD. Changes in rectal temperature and hematologic, biochemical, blood gas, and acid-base values in healthy Labrador Retrievers before and after strenuous exercise. Am J Vet Res. 60(1):88-92. PMID:9918153. 1999.

2) Mesa Sánchez, I; Zaldivar López, S; Couto, CG; Gamito Gómez, A; Granados Machuca, MM; López Villalba, I; Galan Rodríguez, A. Haematological, blood gas and acid-base values in the Galgo Español (Spanish Greyhound). J Small AnimPract. 53(7):398-403. doi: 10.1111/j.1748-5827. 2012.3) O'Brien, MA; McMichael MA; Le Boedec K; Lees G. Reference intervales and age-related changes for venous biochemical, hematological, electrolytic, and blood gas variables using a point of care analyzer in 68 puppies. J Vet EmergCrit Care (San Antonio). 24(3):291-301. doi: 10.1111/vec.12162. 2014.

4) Wingfield, WE; Raffe, MR. The veterinary ICU book. Ed Teton New Media. P: 258-265. 2002.

PC9- DIAGNÓSTICO DE *MYCOPLASMA* HEMOTRÓFICO SPP. OCURRENCIA EN PACIENTES FELINOS QUE CONCURREN AL HOSPITAL ESCUELA FCV. UNLP.ESTUDIO PRELIMINAR

M.E. Pintos[1], M C Stornelli[1], E Bonzo[2], D Posik[3], M.S. Arauz[1]
1 Laboratorio de Análisis Clínicos UNLP; 2 Cátedra de Epidemiología y Salud Pública Básica UNLP, 3 IGEVET UNLP
eugeniapintos@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

La hemoplasmosis, o anemia infecciosa es una enfermedad de distribución mundial, producida por micoplasmas hemotróficos, que causa anemia hemolítica en un amplio rango de especies mamíferas [4;5]. Se han identificado tres especies de hemoplasmas en felinos domésticos: *Mycoplasma haemofelis*, ¨*Candidatus* Mycoplasma haemominutum¨ y ¨*Candidatus* Mycoplasma turicensis¨. La primera es la más patógena y los gatos infectados suelen cursar con anemia aguda del tipo hemolítica, la segunda y tercera son levemente patógenas, y en combinación con *M. haemofelis* o con alguna enfermedad viral pueden desarrollar anemia[2]. Si bien diversos autores comunicaron que la hemoplasmosis en gatos puede transmitirse mediante vectores hematófagos; transfusiones sanguíneas, por vía transplacentaria, por calostro [1] y en forma directa mediante saliva, en la actualidad aún no se ha determinado la vía natural de transmisión entre gatos. La infección con hemoplasma se ha asociado a enfermedades inmunosupresoras tales como Leucemia Viral Felina (ViLeF) e Inmunodeficiencia Viral Felina (VIF) [4]; así como a cuadros de estrés y uso de drogas inmunosupresoras. No ocurre inmunidad cruzada, por lo tanto, los gatos pueden estar infectados con una o más especies de micoplasmas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la ocurrencia de micoplasmas hemotróficos en gatos que concurrieron al Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata durante febrero de 2017 y mayo de 2018, a través de extendido sanguíneo y PCR.

Materiales y método

Se utilizaron 101 felinos que concurrieron a consulta por diversos motivos al Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP en el período mencionado. A cada animal se le realizó la extracción de sangre de la vena yugular, sin sedación previa, colocando 1 ml de la muestra en un tubo con anticoagulante EDTA. Para la realización del hemograma se utilizó un contador celular automático Sysmex (KX-21). Los extendidos sanguíneos se colorearon con May-Grünwald Giemsa. Luego se utilizó la misma muestra con EDTA para extracción de ADN e identificación de los micoplasmas hemotróficos mediante PCR utilizando la técnica descripta por Pintos 2016.

Análisis Estadístico:

Para el análisis estadístico se consideraron las siguientes variables: sexo, edad, hábitos del felino, parámetros sanguíneos y resultado de PCR. Se realizó un análisis descriptivo de los datos y se compararon, mediante Chi cuadrado ($p<0,05$), estas variables según resultado de PCR. Se comparó la concordancia entre las dos técnicas utilizadas (PCR y frotis sanguíneo) mediante el índice Kappa.

Resultados

De la población felina incluida en este estudio, el 47% eran hembras y 53% machos, la edad osciló entre 6 meses y 10 años con una mediana de 5 años. En cuanto a los hábitos, 22% de los felinos positivos y 16% de los felinos negativos tenían acceso al exterior de la vivienda.

Los resultados obtenidos en la observación de extendidos sanguíneos, sólo en 16 (16%) de los 101 animales evaluados presentaron formas coco-bacilares adheridos a la superficie de los eritrocitos, compatibles con *Mycoplasma* hemotrófico *spp*. En cambio con la técnica de PCR se obtuvo que el 50% resultaron positivos a *Mycoplasma* hemotrófico *spp.* Cuando se realizó la comparación entre felinos positivos y negativos, se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) en el recuento de glóbulos rojos (valores por debajo de los valores de referencia), pero no se observaron diferencias significativas entre sexo y hábitos (exterior, interior). Con respecto a la concordancia entre resultados de PCR y de frotis, se observó un valor kappa de 0,12 lo que significa que presenta una baja concordancia.

Discusión

En nuestro trabajo encontramos un elevado número de animales positivos (50%) a *Mycoplasma* hemotróficos*pp*. Estos hallazgos son semejantes a los encontrados por otros investigadores en Japón, Sudáfrica y Canadá [3]. En relación a las evaluaciones hematológicas, sólo se hallaron diferencias significativas en el recuento de eritrocitos. Esto podría estar relacionado con el hecho de que esta bacteria puede, en muchas ocasiones, no causar sintomatología evidente en pacientes que no se encuentran inmunológicamente comprometidos. No hubo concordancia de los resultados entre la observación del microorganismo en los extendidos sanguíneos y las muestras evaluadas mediante PCR; esto se debe a la baja sensibilidad del primer método, ya que depende de la carga bacteriana. Además la observación microscópica de extendidos sanguíneos es muy dependiente del entrenamiento del operador[3].En relación a los hábitos, si bien se esperaría un mayor número de animales positivos a hemoplasma entre la población que vive en el exterior, no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos, es probable que se requiera un mayor número de animales estudiados. Evaluaciones futuras con un mayor número de animales nos permitirán conocer la prevalencia de esta enfermedad en nuestro medio.

Bibliografía

1-Bergmann M, Englert T, Stuetzer B, Hawley JR, Lappin MR, Hartmann K. Risk factors of different hemoplasma species infections in cats. BMC Vet Res. 2017; 13(1):52.

2-Campos Aquino L, Hicks C, Scalon M, Lima M, Lemos M. Prevalence and phylogenetic analysis of haemoplasmas from cats infected with multiple species. J Microbiol Methods. 2014; 107:189-196.

3-Pintos M E. Diagnóstico de *Mycoplasma suis* con técnicas convencionales y de biología molecular. Su relación con circovirus porcino tipo 2. Tesis Doctoral FCV.UNLP. (2016).

4-Sykes JE. Feline Hemotropic Mycoplasmas. Vet Clin Small Anim 40. 2010; 1157-1170.

5-Tasker S. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? J Feline Med Surg. 2010;12(5):369-81.

PC10- COMPORTAMIENTO DE LA ACTIVIDAD SÉRICA DE GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA (GGT) EN TERNEROS NEONATOS: ESTUDIO PRELIMINAR

F. Aguirre[1]; J. Jaime.[1]; J. Barolín[1]; J. Almada[2].; R. Fahler.[2]; M. Allassia.[2]; M.F.Ruiz[1]
1.Laboratorio de Análisis Clínicos. 2. Hospital de Salud Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNL.
faguirre@fcv.unl.edu.ar

Introducción

El ternero nace con mínimas defensas orgánicas para hacer frente a los diferentes organismos patógenos a los cuales se va a exponer durante su crianza, por lo cual debe adquirir inmunidad pasiva a través del consumo de calostro, primera secreción de la glándula mamaria luego del parto. Por tal motivo se han desarrollado diversos métodos para determinar en forma rápida y económica la eficiente adquisición de inmunidad pasiva por el ternero. Uno de los métodos más usados por su practicidad y rapidez es la determinación de proteínas totales mediante refractometría. Esta técnica tiene una alta correlación con la inmunodifusión radial (técnica de referencia) cuando el animal es muestreado al tercer día de vida. Su principal limitación es la de verse alterado su resultado debido a hemoconcentración o por patologías perdedoras de proteínas. La cuantificación de la actividad de Gamma Glutamil Transferasa (GGT) ofrece una alternativa valiosa. El calostro bovino contiene una gran cantidad de GGT la cual es absorbida junto a las inmunoglobulinas por el ternero. La actividad sérica de esta enzima aumenta abruptamente a las 24 horas de vida para luego ir decayendo lentamente. Debido a este comportamiento, la actividad de GGT varía de acuerdo a los días de edad que tenga el animal al momento del muestreo. Para evaluar el correcto calostrado, la mayor parte de los investigadores interpretan el resultado de acuerdo al valor alcanzado al pico máximo (entre las 24 y 48 horas de nacido). En condiciones de campo, para realizar un seguimiento de la transferencia de inmunidad en un rodeo, resulta impráctico realizar múltiples muestreos diarios para contemplar que todos los animales se encuentren dentro de ese lapso. Por lo cual es necesaria mayor información sobre las variaciones que ocurren con esta enzima más allá de los primeros días de vida. El presente trabajo tiene como objetivos:

-Analizar el comportamiento de la actividad sérica de GGT de terneros con diferentes grados de transferencia de inmunidad.

-Establecer valores que puedan ser utilizados de referencia para interpretar los resultados en animales muestreados dentro de la semana de edad.

Materiales y método

Se trabajaron con 29 terneros nacidos en un establecimiento bovino lechero comercial. Se realizó el manejo habitual de dicho sitio de suministrar 2 litros de calostro a todas las crías antes de las 12 horas de vida. Se tomaron muestras de sangre por venipunción yugular a todos los terneros, una vez al día desde las 24 horas de nacido hasta los 7 días de vida. Las muestras se derivaron al Laboratorio de Análisis Clínicos en donde se separó el suero sanguíneo por centrifugación y se almacenó el mismo congelado hasta su procesamiento. Se realizó la estimación de la actividad GGT mediante autoanalizador Metrolab 2000plus con el kit γ-G-test cinética AA líquida (Wiener Lab). De este modo se estimó la tendencia de la enzima de acuerdo a la edad del animal. A la vez, se realizó la cuantificación de proteínas totales mediante refractómetro Grandindex RHC-300ACT en la muestra de suero del tercer día de vida de cada animal a fin de poder clasificar la eficacia de la absorción de inmunoglobulinas de acuerdo al criterio de Quigley (2013). Se catalogaron a los terneros en “bien calostrados”(> 5,5 g%), “calostrado medio” (entre 5 y 5,5 g%) y “mal calostrado”(< 5g%). Se relacionaron los valores de la actividad de GGT de acuerdo al resultado de proteínas totales.

Resultados

En el siguiente gráfico se muestran las tendencias de las medias de los grupos analizados: (ver gráfico 1)

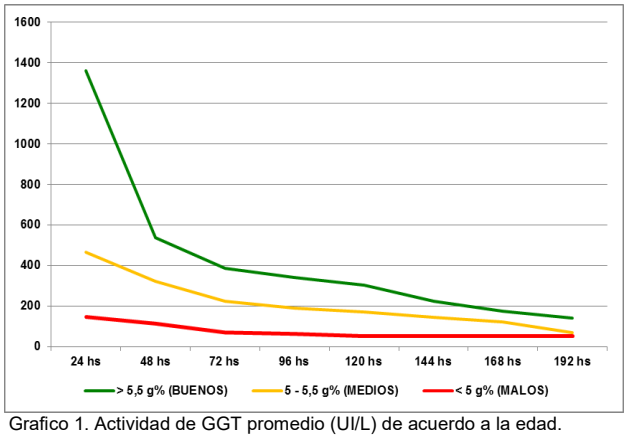


Grafico 1. Actividad de GGT promedio (UI/L) de acuerdo a la edad.

Se puede observar el comportamiento típico de la actividad sérica de GGT, en donde el valor máximo (pico) ocurre a las 24 horas de nacido para luego descender abruptamente en los días posteriores, llegando dentro de varios días a los valores basales reportados para adultos. Se muestra también, una tabla en donde se transcriben los rangos (valores mínimos y máximos) de acuerdo a la edad del animal y a su clasificación de acuerdo al valor de proteínas totales al tercer día de vida (ver tabla 1).

Discusión y conclusiones

En este estudio, la actividad de la enzima se comportó de manera similar a como fue descripta por otros autores. Se incluyeron animales que si bien habían consumido calostro, la cantidad de inmunoglobulinas absorbidas no fue la adecuada, siendo los valores de GGT sérica marcadamente diferentes en los primeros días de vida, pero también diferenciables hasta el día 7 a pesar que los límites representados por los valores mínimos y máximos pueden superponerse entre los grupos. Los valores aquí obtenidos pueden ser utilizados de guía a fin de ayudar a interpretar el resultado de animales muestreados entre las 24 horas de nacido y hasta 7 días de edad. De todas maneras, sería necesario para estudios posteriores poder repetir la experiencia, en un mayor número de terneros, con técnicas más específicas y sensibles (como la inmunodifusión radial) a fin de obtener valores diarios de actividad GGT que puedan ser utilizados de referencia para la especie.

Bibliografía

Carrasco M. 2000. Determinación de la actividad serica de la enzima GGT como indicadora del consumo de calostro en terneros. Universidad Austral de Chile, http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2000/fvc198d/doc/fvc198d.pdf

García J, Albornoz O, Vela D. 2006. Determinación de inmunoglobulinas séricas de origen calostral en terneros recién nacidos. Bol. Téc. 6, Ser. Zool.:77-85.

Quigley JD, Lago A, Chapman C, Erickson P, Polo J. 2013. Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. J. Dairy Sci.96:1148-1155.

Tabla 1: Valores de GGT (UI/L) más bajos y más altos en cada muestreo

	24 hs		48 hs		72 hs		96 hs		120 hs		144 hs		168 hs	
	menor	mayor	menor	mayor	menor	mayor	menor	mayor	menor	mayor	menor	mayor	menor	mayor
> 5,5 g% (BUENOS) (n:17)	744	3578	307	1234	157	835	108	507	61	489	58	382	42	270
5 - 5,5 g% (MEDIOS) (n: 4)	274	865	166	483	146	401	123	338	91	289	69	228	50	195
< 5 g% (MALOS) (n: 8)	52	264	48	246	37	167	29	122	28	103	18	67	19	41

PC11- IMPORTANCIA EN LA APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA DE CASOS CLÍNICOS A TRAVÉS DEL EXAMEN DEL SEDIMENTO URINARIO

M.F.Ruiz[1]; F. Aguirre[1]; R. Zimmermann[1];S. von der Thüsen[1]; N.Bianchini[1]; P. Fuster[1]; N. Russi[2]; R. Marini[3]; A. Sánchez[3] ; A.Sciabarrasi[4]

[1]Laboratorio de Análisis Clínicos. [2]Laboratorio de Microbiología. [3]Laboratorio de Anatomía Patológica. Hospital de Salud Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.

Estación Zoológica Experimental La Esmeralda, Ministerio de la Producción, Santa Fe. mruiz@fcv.unl.edu.ar

Introducción. El examen del sedimento urinario es una de los métodos biológico complementarios más solicitado por el clínico veterinario, consiste en la observación microscópica de la orina centrifugada y concentrada. Cifuentes (1974), señala que la ayuda que puede proporcionar un sedimento de orina posee un valor incuestionable y de gran transcendencia no solo para detectar enfermedades del tracto urinario sino también para la aproximación diagnóstica de enfermedades sistémicas. Sin embargo, la experiencia indica que la masificación producida en los últimos años en las órdenes de análisis ha influido negativamente en el tiempo y la atención que requiere su práctica e interpretación profesional. El presente trabajo tiene como objetivo revalorizar el examen del sedimento de orina como herramienta diagnóstica en la clínica veterinaria diaria.

Descripción de los casos. A continuación, se comunican algunos casos clínicos en los que el examen del sedimento urinario resultó de valor fundamental para el diagnóstico de patologías del tracto genitourinario como sistémicas.

Caso 1, se procesó una muestra de orina de un canino, macho, mestizo, de 6 meses de edad, con hematuria macroscópica. En el examen microscópico del sedimento urinario se observó gran cantidad de hematíes, regular cantidad de células transicionales aisladas y en colgajos, presencia de cristales de oxalato de calcio y numerosos huevos cuyas características morfológicas son compatibles con los huevos de *Dioctophyma renale* (ovalados, de aproximadamente 70 µ x 40 µ, de color amarillento, con abollonaduras en toda su superficie y polos lisos) (Figura n°1, A, 40x). Además se observó la presencia de abundantes pseudohifas (Figura n° 1, B, 40 X).

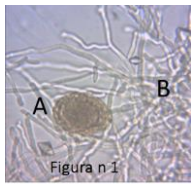


Figura n 1

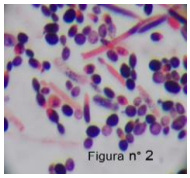


Figura n° 2

La muestra se derivó al laboratorio de Microbiología para su cultivo e identificación. Se evidenció crecimiento de levaduras con pseudohifas, se realizó la prueba de tubo germinal, confirmándose de esta forma la presencia de *Candida albicans* (Figura 2. 100x).

Caso 2, canino, hembra, pinscher, 9 años. Se presentó a la consulta con depresión, anorexia, crisis convulsivas, polidipsia/ poliuria. En el sedimento urinario se hallaron abundantes cristales de biurato de amonio (Figura n° 3, 40x). Junto a la bioquímica sanguínea (uremia 3,2 mg/dl; proteínas séricas totales 4,1 g/dl; albúmina 1,2; colesterol 50 mg/dl; glucemia 55,8 mg/dl; ALT 208 UI/l, Bilirrubina Total 1.1 mg/dl) se arribó al diagnóstico de Shunt portosistémico con atrofia hepática.

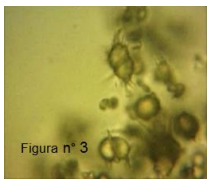


Figura n° 3

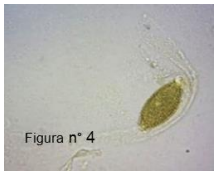


Figura n° 4

Caso 3, felino, hembra, mestizo, 2 años de edad, bajo antibioticoterapia por sospecha de cistitis bacteriana desde hace 10 días. El propietario del animal decide hacer una interconsulta con otro veterinario, quien solicita un urianálisis y un urocultivo. Durante la investigación microscópica del sedimento se observaron escasos hematíes y leucocitos, escasos cristales de fosfato triple, filamentos de moco y la presencia de huevos cuya morfometría (ovales de 52 x 30 µm, doble membrana, con tapones polares ligeramente aplanados) corresponde a *Pearsonema plica* (Figura n° 4, 40x). El cultivo fue negativo.

Caso 4, canino, macho, 12 años, mestizo, con hematuria intensa. La observación del sedimento advertía abundantes eritrocitos y leucocitos, abundantes células de morfología redonda aisladas y en grandes colgajos, con grandes núcleos, marcada anisocitosis y vacuolización perinuclear (Figura n° 5, 40x). Se remitió una alícuota del sedimento al laboratorio de Anatomía patológica. El examen citológico describió abundante material, sobre un fondo de glóbulos rojos, se observan gran cantidad de polimorfonucleares neutrófilos y piocitos. Entre medio de las células inflamatorias, se observan colgajos de células epiteliales de diferentes tamaños, y algunas células sueltas. Las células son redondas a poligonales, con núcleos grandes e hipercromáticos, nucléolos evidentes y citoplasmas vacuolados, algunos con granulación azul. La vacuolización es predominantemente perinuclear. La basofilia citoplasmática es notable. Algunas células muestran mayor tamaño, con macrocariosis y aspecto bizarro. También se observan células multinucleadas y mitosis (Figura n° 6, 40x). La ecografía posterior reveló una neoplasia epitelial maligna, de origen prostático, con inflamación purulenta agregada.

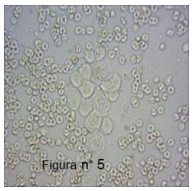


Figura n° 5

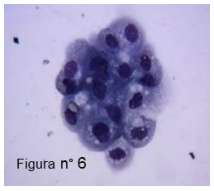


Figura n° 6

Caso 5, corresponde a un aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*), macho, de 12 años de edad, incautado a una familia santafesina. Para evaluar el estado sanitario del mismo se solicitó entre otros análisis de laboratorio, el examen del sedimento urinario para la búsqueda de *D. renale*. Durante la microscopia del mismo se evidenció regular cantidad de eritrocitos, escasos leucocitos, regular cantidad de células del epitelio de transición y abundante cantidad de cristales de cistina. La cistinuria es una enfermedad metabólica de alta predisposición hereditaria, que se presenta con cristaluria pudiendo ocasionar urolitiasis. La imagen ecográfica del paciente no demostró la presencia de cálculos. La cistinuria es frecuente tanto en aguará guazú silvestres como en los mantenidos en cautiverio. En Argentina, se ha registrado el caso de una hembra en cautiverio con presencia de cristales de cistina en orina y microlitiasis vesical diagnosticada ecográficamente

Figura n° 7

Conclusión. El examen de sedimento urinario es una herramienta fácil de ejecutar, sencilla, precisa, confiable, rápida y económica que debería ser empleada por el veterinario en su actividad diaria no solo en el diagnóstico de diferentes patologías, sino también para establecer tratamientos apropiados, emitir pronósticos serios y vigilar la evolución del paciente.

Bibliografía

Dalet F. El Sedimento Urinario: ¿Qué Hay De nuevo en algo Tan Viejo? Revista Electrónica Diagnóstico In Vitro 1. En: www.Pncq.Org.Br/Participantes/Doc/Dalet.Pdf Consulta: Julio

Latimer, K.S.; Mahaffey, E.A.; Prasse, K.P. 2005. Patología clínica. 4° Edición. Multimedia. Barcelona, España.

Perez Tort, G.; Iglesias, M.F. Más, J. 2008. Atlas de parasitología en pequeños animales. InterMédica, Bs As, Argentina.

Orosco, M.M.; González Ciccia, P.; Soler, L. 2015. El aguará guazú en la Argentina. CEBBAD. Bs As, Arg

PC12- CRISTALURIA Y UROLITIASIS POR CISTINA EN CANINOS MACHOS DE RAZA BULLDOG

L.L. Fontana[1-2]; M.C. Redelongi[1]; D.A.Vidal[1-2]; S. Mazzoni[1-2]; C.A. Savignone[2-3]
1.-Actividad privada; 2.-Servicio Central de Laboratorio del Hospital Escuela, 3.-Cátedra de Bioquímica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata
lorenafontana27@gmail.com

Introducción

La cistinuria es una anomalía congénita debido a un defecto en la reabsorción tubular de aminoácidos, resultando en un aumento de la excreción urinaria de cistina y de aminoácidos dibásicos (ornitina, lisina, y arginina). Se halla descripta con mayor prevalencia en Bulldog inglés, Terranova, Staffordshire Bull terrier y Bulldog francés; con mayor incidencia en los machos (Hoppe A. y col., 2001; Vrabelova D. y col., 2011).

A pesar de verse incrementados los niveles urinarios de varios aminoácidos, únicamente el aumento de los niveles de cistina excretados es capaz de producir cristales y en algunas ocasiones cálculos, lo que da nombre a la enfermedad.

El defecto congénito se encuentra en un transportador localizado en el ribete en cepillo apical de las células del túbulo recto proximal renal (HAT o transportador de aminoácidos heterodimérico) Este transportador está constituído por dos proteínas: una cadena pesada o glicoproteína transmembrana de un solo paso, codificada por el gen SLC3A1 y una cadena ligera (proteína no-glicosilada transmembrana multipaso) codificada por el gen SLC7A. (Orts Costa J. y col., 2003), habiéndose identificado una herencia autosómica en la raza Terranova y suponiéndose que existe en otras razas (Hoppe A. y col., 2001). La cistina, producida por oxidación de cisteína es altamente insoluble, por lo que, al no poder reabsorberse a nivel renal por defecto en el transportador, precipita a pH ácido en los túbulos renales dando lugar a la aparición de cristales de cistina. En condiciones normales en el riñón se reabsorben más del 95% de los aminoácidos filtrados, sin embargo, en los pacientes con cistinuria casi el 100% de la cistina filtrada se excreta en la orina.

Los cristales de cistina tienen forma plana hexagonal característica, ya sean aislados o bien formando agrupaciones denominadas maclas.

La presencia de cristales en la orina no lleva consigo necesariamente la aparición de signos clínicos, pero en algunas ocasiones los cristales, que son microscópicos, pueden agregarse formando estructuras de mayor tamaño que al no poder ser eliminados, pueden originar signología clínica, especialmente cuando alcanzan un cierto tamaño. Estas estructuras, macroscópicas, se denominan urolitos (Osborne y col. 1999). Se desconoce el mecanismo exacto de la formación de urolitos de cistina ya que muchos perros con cistinuria no forman cálculos. El aspecto macroscópico que presentan los cálculos puros de cistina, es de color miel-caramelo o blanquecino, céreo, brillante muy duro; de morfología y tamaño variable (aunque generalmente redondeados). Los urolitos están constituidos por un 95% de cristaloides (agregados cristalinos) inorgánicos, con un 5% de matriz orgánica, compuesta principalmente por albúmina y gamma globulinas. Los cálculos de cistina se localizan en un 97% en el tracto urinario inferior y raramente en el tracto urinario superior (Tion M. y col., 2015).

El objetivo del trabajo fue describir la aparición de cristaluria y urolitiasis por cistina en caninos.

Descripción de casos. En el período comprendido entre agosto de 2017 y julio de 2018 se recibieron en un laboratorio privado de la zona sur del gran Buenos Aires, muestras de orina de la primera hora de la mañana, de 5 pacientes, derivados de clínicas y hospitales veterinarios próximos. Las mismas eran de caninos machos, de entre 3 y 4 años de edad, de raza Bulldog inglés (3) y Bulldog francés (2). En el protocolo de ingreso se informaba que los animales presentaban polaquiuria, disuria y en algunas situaciones, episodios de hematuria. Una vez ingresadas las muestras todas fueron conservadas a 4°C. y procesadas antes de las 6 hs de extraídas. Se les realizó el análisis físico- químico y del sedimento urinario. Además, de dos pacientes, luego de realizar tratamiento quirúrgico se remitieron también cálculos para el estudio de su composición.

Resultados

La totalidad de las muestras presentaban una elevada densidad urinaria, turbidez en diferente grado, valores variables de proteínas, presencia de células transicionales y cristales de cistina. En cuatro de ellas se pudo observar la presencia de eritrocitos en el sedimento urinario y dos de las muestras presentaron regular cantidad de cristales de fosfato triple y fosfato amorfo.

Con respecto al estudio de la composición de los cálculos proveniente de 2/5 pacientes se obtuvo el siguiente resultado:

En un paciente se trató de varios urolitos pequeños (menos de 5 mm de diámetro), de color blanquecino, redondeados, duros y de superficie lisa. El cálculo restante era único, color caramelo, de un cm de diámetro, con superficie rugosa y consistencia dura. La determinación de la composición química de los mismos se realizó con el kit para cálculos urinarios de Biopur® dando positiva la reacción con el nitroprusiato-sulfito sódico, por lo que se demostró la presencia de cistina en los mismos.

Discusión y conclusiones. La urolitiasis en caninos es una enfermedad multifactorial que representa un problema clínico importante para los propietarios de dichas mascotas. La urolitiasis por estruvita asociado a infección urinaria (ITU) es una de las causas más frecuente en perros. En cambio, la cistinuria es una enfermedad congénita con predisposición de raza, edad y sexo. Por lo tanto, si en las razas mencionadas se presenta polaquiuria, disuria con episodios de hematuria, desde una edad muy temprana hace sospechar la posible existencia de un problema metabólico congénito cuyo diagnóstico diferencial en las razas Bulldog incluye urolitiasis por cristales de urato y cristales de cistina. Por lo expuesto es necesario remarcar la importancia de descartar o confirmar la existencia de ITU e identificar el tipo de cristales presentes en orina o la composición de los cálculos para establecer las medidas de tratamiento y prevención adecuadas, ya que en el caso de urolitos de fosfatos se debería acidificar la orina para su disolución, en cambio, si se trata de cálculos de cistina se debería alcalinizar la orina y utilizar agentes quelantes, teniendo en cuenta su alta tasa de recidivas. Además como prevención, no debemos olvidar que esta patología es una anomalía congénita y que la selección genética es una herramienta indispensable para erradicarla.

Bibliografía

-Hoppe A, Denneberg T. Cystinuria in the dog: Clinical studies during 14 years of medical treatment. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2001;15(4):361-367.

-Orts Costa JA, Zúñiga Cabrera A, Martínez de la Cámara y Salmerón J. Actualización de la cistinuria: aspectos clínicos, bioquímicos y genéticos. An Med Interna (Madrid) 2003; 20: 317-326.

-Osborne CA; Sanderson SL; Lulich JP; Bartges JW; Ulrich LK; Koehler LA; Bird KA; Swanson LL. Canine cystine urolithiasis. Cause, detection, treatment, and prevention. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1999; 29(1):193-211.

-Tion MT, Dvorska J, Saganuwan SA. A review on urolithiasis in dogs and cats. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 2015;18(1):1-18.

-Vrabelova D, Silvestrini P, Ciudad J, Gimenez JC, Ballesteros M, Puig P, Ruiz de Gopegui R. Analysis of 2735 canine uroliths in Spain and Portugal. A retrospective study: 2004-2006. Research in Veterinary Science. 2011;91(2):208-211

PC13- ESTUDIO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN ERITROCITOS CANINOS. LA QUIMIOLUMINISCENCIA COMO MÉTODO COMPLEMENTARIO DE DIAGNÓSTICO

S.A. Savignone[1,2]; J.L. Barberón[1]; P.J. Leaden[1]; P.A. Zeinsteger[1]; M.B. Ventura[1-3]; A. Palacios[1,3]
1.- Cátedra de Bioquímica; 2.-Servicio Central de Laboratorio del Hospital Escuela, 3.-Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias; Universidad Nacional de La Plata.
csavig@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

El daño o estrés oxidativo es la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes, y los antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (Venereo Gutierrez, 2002). Esto trae como consecuencia alteraciones en la relación estructura-función de cualquier órgano, sistema-aparato o grupo celular especializado; por lo tanto, se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos (Drogue, 2002). Los eritrocitos son estructuras biológicas que poseen altas cantidades de ácidos grasos polinosaturados, oxígeno molecular, así como hierro con diferentes estados de oxidación, por lo que son altamente vulnerables a los procesos de peroxidación (Herlax y col., 2011, Kumar, 2011). La quimioluminiscencia iniciada con hidroperóxido de t-butilo (t-BHP) en suspensión de lisado de glóbulos rojos es una técnica que nos permite evaluar el estrés oxidativo en estas células. La luteína es conocida por su efecto antioxidante, químicamente es un derivado del α-caroteno y pertenece al grupo de las xantófilas.

En Argentina, son escasos los métodos complementarios utilizados de rutina en medicina veterinaria en el diagnóstico para concluir que el paciente presenta estrés oxidativo en sus membranas biológicas.

Los objetivos de este trabajo fueron estudiar el comportamiento de membranas de glóbulos rojos en presencia de agentes oxidantes y analizar el efecto protector de la luteína en la peroxidación de las membranas de glóbulos rojos caninos.

Materiales y métodos

Se tomaron muestras de sangre entera de 4 caninos sanos, que asistieron al Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, para realizar un chequeo hematológico de rutina.

Los eritrocitos obtenidos fueron separados del resto de los componentes sanguíneos por centrifugación (1000 g por 10 minutos) en centrifuga refrigerada marca Biofuge 15R. El plasma y el resto de los componentes formes fueron descartados. El pellet obtenido fue lavado tres veces en buffer fosfato isotónico (PBS 5 mM; pH 7,4; 150 mM NaCl). Finalmente, a partir del concentrado de eritrocitos lavados, se procedió a la lisis de los mismos mediante el agregado de una solución de PBS 5 mM, homogeneización y en contacto con hielo durante 30 minutos (Dodge y col., 1963). Las suspensiones obtenidas se conservaron durante 24 horas con y sin la adición de concentraciones crecientes de luteína (50 µg y 150 µg) (Luteína 20 mg. Piping Rock Laboratories, USA). Todas las operaciones y la conservación de las muestras se realizaron a 4°C.

La etapa final consistió en diluir las suspensiones de eritrocitos lisados en una solución de lavado (PBS 5 mM; pH 7,4; 150 mM NaCl), hasta una concentración final de 0,25 mg/ml de hemoglobina, de acuerdo al valor obtenido en el hemograma correspondiente al chequeo previo. Una vez diluidas, las muestras adicionadas con luteína fueron incubadas con la adición de 2 mM de t-BHP [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA]. Idénticas alícuotas de las muestras sanguíneas fueron adicionadas en el momento con 50 µg y 150 µg de luteína y también incubadas bajo las mismas condiciones. Una quinta alícuota, sin la adición de luteína, fue incubada de la misma manera. Como experimento control para los productos de peroxidación endógenos en la preparación de eritrocitos lisados se incubó en conjunto una muestra sin ningún agregado. Se realizó la medición de la emisión de luz mediante un contador de centelleo líquido (Packard 1900 TR) para la cuantificación de la peroxidación de cada muestra. La quimioluminiscencia se determinó durante un período de 60 minutos y se registró como cuentas por minuto (cpm) cada 10 minutos.

Los resultados obtenidos se expresan como la diferencia entre las cpm totales de cada muestra (originadas a partir de la emisión de luz) menos las cpm totales de la muestra control.

Resultados

Se observó que los valores obtenidos eran menores tanto en las muestras con luteína adicionada 24 horas previas ($111x10^4$ y $114x10^4$ en 50 µg y 150 µg de luteína, respectivamente) como en las muestras a las que se adicionó luteína al momento de la incubación ($100x10^4$ y $102x10^4$ en 50 µg y 150 µg de luteína, respectivamente) en relación al grupo control ($160x10^4$) (Fig.1). No hubo diferencias en relación al momento en que se adicionó la luteína en las muestras.

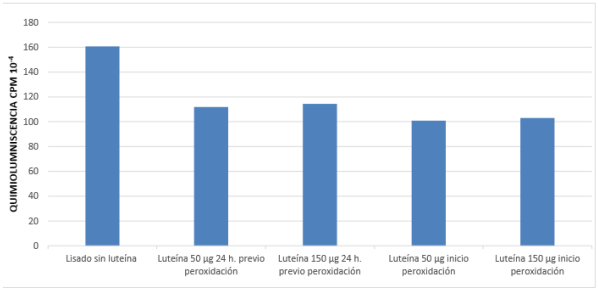


Fig.1

Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos indican que la quimioluminiscencia podría utilizarse como un método complementario de diagnóstico del estrés oxidativo y que la luteína puede actuar como un posible antioxidante que protege las membranas de eritrocitos del daño oxidativo.

Bibliografía

-Dodge JT, Mitchell C, Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch Biochem Biophys. 1963; 100: 119-30.

-Drogue W. Free radicals in the physiological control of cell function. Phys Rev. 2002; 82: 47-95.

-Herlax V, Vazquez R, Mate S, Bakás L. Eriptosis, la muerte suicida de eritrocitos: mecanismo y enfermedades asociadas. Acta Bioquím Clín Latinoam 2011; 45: 287-96.

-Kumar A. Biomedical studies on lipid peroxidation and erythrocyte fragility during the process of aging. Asian Pac J Trop Biomed. 2011; 1: 6-7.

Venereo Gutiérrez JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev Cubana Med Milit. 2002; 31 (2): 126-33

PC14- UROLITIASIS PERSISTENTE COMPLICADA EN CANINO ASOCIADA A INFECCIÓN URINARIA POR *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS*

M. Clausse [1,2], C. Cacciato[3,4], S. Martinez [1,2], V. Cavilla[1,2], G. Escuer[1,2], M.J. Del Sole [1,2], C. Monteavaro[3,2]
[1]Hospital Escuela de Pequeños Animales (HEPA), Facultad de Cs. Veterinarias (FCV), Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), [2]Centro de Investigaciones Veterinarias (CIVETAN-CONICET), [3]Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental, FCV-UNCPBA.[4] Personal de apoyo CIC-PBA.
email: cmonteav@vet.unicen.edu.ar

Introducción

La urolitiasis por estruvita en caninos está asociada habitualmente a infecciones de tracto urinario por gérmenes ureasa positivos. Esta enzima desdobla la urea en amonio, contribuyendo a la formación de cálculos por disminución de su solubilidad en medio alcalino.

El objetivo del este trabajo es reportar el caso de un canino Beagle de 5 años de edad con infección urinaria complicada por urolitiasis persistente.

Materiales, métodos y resultados

El animal había presentado un primer episodio de urolitiasis, se encontraba en mal estado corporal y parasitado. Debido a la presencia de un urolito de gran tamaño (20 x 45 mm) se había llevado a cabo una cistotomía. Asimismo se había indicado una antibioticoterapia con Enrofloxacina (5 mg/kg/día durante 60 días) y un alimento comercial para pacientes con patologías de tracto urinario bajo.

A los 5 meses llega a consulta con un cuadro de urolitiasis obstructiva, observándose en la ecografía abundante presencia de sedimento y urolitos. En el análisis de orina se evidencia hematuria, proteínas, pH 6.5 y presencia de bacterias y cristales en el sedimento. En un principio, mediante sondaje se logra recuperar la micción. Sin embargo, la obstrucción se repite en varias oportunidades, incluso con la sonda colocada y se decide realizar una uretrostomía. Se comienza nuevamente terapia antibiótica con enrofloxacina y se envía muestra de orina tomada por cistocentesis para urocultivo y antibiograma al Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental (LMCyE) de la Facultad de Cs. Veterinarias de la UNCPBA. Se aisla *Escherichia coli* con resistencia a Trimetoprim-sulfametoxazol y Enrofloxacina, resistencia intermedia a Cefalexina y sensibilidad a Amoxicilina-Ácido clavulánico, Estreptomicina y Amicacina. Se instaura una nueva antibioticoterapia con Amoxicilina + Ác. Clavulánico (Optamox, 20 mg/kg/12 hs).

Durante 10 días presentó repetidas obstrucciones, se evidenció un aumento del tamaño de los urolitos vesicales (pese a la orina con pH ácido) y una secreción purulenta continua en el prepucio. Se decide realizar una nueva cistotomía para retirar los urolitos y tomar muestras de pared vesical, y una amputación de pene. Las muestras de orina, mucosa vesical y urolito se remitieron al LMCyE para su cultivo. Un urolito se envió al laboratorio Perez Cambet (Tandil) para su caracterización. La composición de los urolitos resultó ser fosfato amónico magnésico (estruvita).

En el cultivo se obtuvieron dos aislamientos correspondientes a *Escherichia coli* y *Staphylococcus xylosus* coagulasa (-) ureasa (+) fermentación xilosa (+).

El predominio de cada aislamiento según la muestra de origen fue la siguiente:

	Núcleo urolito	Mucosa	Orina
E. coli	-	+	+++
Staphylococcus spp.	+++	+++	-

El antibiograma arrojó los siguientes resultados:

	Escherichia coli	*Staphylococcus*
Penicilina	R	Sensible
Cefoxitina	Sensible	Sensible
Clindamicina	R	R
Eritromicina	R	R
Ciprofloxacina	R	R
Gentamicina	R	R
Amikacina	-	Sensible
Tetraciclina	-	Sensible
Trimetoprim sulfa	-	R

Se continuó el tratamiento con Amoxicilina + Ac clavulánico durante 15 días. Se realizaron urocultivos de control a los 15, 30 y 60 días, que resultaron sin aislamientos.

Conclusión

A pesar de que existen factores predisponentes a la producción de cálculos de estruvita, su formación es improbable sin la presencia de la enzima ureasa producida por bacterias. Por ello, frente a un cuadro de infección urinaria y, especialmente, frente a uno de urolitiasis es indispensable realizar el urocultivo (1). El caso presentado es un ejemplo particular de un manejo clínico incompleto, ya que no se intentó el aislamiento al inicio de la patología. Asimismo, el tratamiento antibiótico se mantuvo por un período de tiempo demasiado prolongado, agravado por la ausencia de aislamiento y estudio de sensibilidad.

Escherichia coli y *Enterococcus* spp. son los patógenos de mayor incidencia en ITU en caninos, con el 56% y 25% de los casos respectivamente (1). *Staphylococcus* spp. ha sido aislado con baja incidencia (7%). Aunque los *Staphylococcus* coagulasa positivos resultan los más prevalente en la piel sana del canino (93%), *S. xylosus* es la especie coagulasa negativa más frecuente (2).

Resulta interesante observar la proporción de cada especie aisladas en este trabajo cuando se enviaron distintas muestras para cultivo (orina, vejiga y urolito). Allí se evidencia el acantonamiento del microorganismo responsable de la urolitiasis dentro de los cálculos y la mucosa vesical. Asimismo, explica el aislamiento de una única especie (*E. coli*) en orina anteriormente. La infección secundaria con *E. coli* podría haber sido desencadenada por la inflamación e irritación producida por los urolitos. Otro mecanismo podría haber sido la colonización de *S. xylosus* luego de una ITU subclínica por *E. coli*. Sin embargo, el mal estado corporal del paciente resulta un factor esencial, que es capaz de alterar la resistencia natural del huésped contra la infección del tracto urinario bajo.

Bibliografía

(1) Seguin, M. A., et al (2003. Journal of Vet Int Med, 17(5), 622-631.
(2) Weese, J. S., et al (2011). Veterinary medicine international.
(3) Cox, H. U., et al (1988). Am J of Vet Res, 49(6), 747-751.

PATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

PT1-DESCRIPCIÓN DE CASO DE FOTOSENSIBILIZACIÓN SECUNDARIA POR *LANTANA CAMARA* EN SAN LUIS

A. Bengolea [1]; C. E. Rossanigo[1]; R. Sager [1]
1- Laboratorio de Sanidad Animal. EEA INTA San Luis. (V. Mercedes).
E-mail:bengolea.adriana@inta.gob.ar

Introducción *Lantana camara* (nombre vulgar Bandera Española) es un arbusto invasivo semileñoso que pertenece a la familia de las Verbenáceas, utilizada como planta ornamental. Es una planta perenne de 1-2 m de altura probablemente originaria de centroamérica, con flores que difieren según la variedad pudiendo ser amarillas, naranjas, rojas, blancas, rosadas o violetas. *Lantana* sp. está muy extendida en nuestro país colonizando distintas pasturas y montes reduciendo la disponibilidad forrajera para el ganado, afectando la biodiversidad y la economía ganadera a través de su toxicidad. Las especies afectadas por la intoxicación por *Lantana* sp.son bovinos, ovinos, caprinos y conejos. Las toxinas de lantana significativas son los ácidos triterpénicos, el lantadeno A y B. Se estima que la dosis tóxica de la hoja fresca es el 1% del peso corporal de un animal. Los tóxicos absorbidos producen injuria hepática con daño de las membranas de los canalículos biliares, lo cual deriva en colestasis e hiperfiloeritrinemia con los resultados de ictericia, fotosensibilización y parálisis ruminal por acción directa de las toxinas. La muerte se debe a la insuficiencia hepática y al fallo renal. El presente trabajo tiene por objetivo aportar información sobre la sintomatología, lesiones macro y microscópicas de un caso por intoxicación de *Lantana camara* en vacas en un establecimiento del este de la provincia de San Luis.

Materiales y métodos

En el mes de abril del 2018 se solicita la asistencia técnica de profesionales del grupo de sanidad animal de la EEA San Luis en un establecimiento en el paraje Las Vizcacheras (33° 56′ S - 65° 14′ E) en el límite entre las provincias de Córdoba y San Luis (departamento Gral. Pedernera). El establecimiento estuvo cerrado y sin mantenimiento por más de tres años. La consulta se origina a raíz de un segundo brote de animales con fotosensibilización (con lesiones en morro, vulva, ojos, pezones y cruz), adelgazamiento, ictericia, fotofobia y edema en párpados y orejas en vacas de raza Angus y cruzas Hereford. El primer brote ocurrió durante los meses del verano anterior (diciembre-enero) en un rodeo de 110 vacas con una morbilidad del 8,2 % (9/110) y una letalidad del 22,2% (2/9). Los animales afectados fueron tratados con AINE, protector hepático y antibiótico y no evidenciaron mejoras. El segundo brote ocurrió en otoño con los mismos signos afectando un total de 8 animales y un muerto. Se realizó examen clínico en los animales enfermos y la necropsia del animal muerto con la toma de muestras de órganos afectados para el estudio histopatológico. Se realizó una recorrida exhaustiva de los diferentes potreros con el objeto de identificar la planta hepatotóxica.

Resultados

En el examen clínico se observó decaimiento general, anorexia, ptialismo, lagrimeo,epífora, fotofobia intensa, edema de párpados, vulva y pabellones auriculares; y dermatitis por fotosensibilización especialmente en morro, vulva y pezones, tanto en animales pigmentados como en animales con áreas de piel no pigmentada. La región del morro y ollares fueron las zonas más afectadas, evidenciando eritema, congestión y hemorragia, con secreciones mucopurulentas abundantes, engrosamiento y necrosis con desprendimiento de la piel de la zona. A la necropsia se observó ictericia generalizada en subcutáneo, grasa de color amarillo, hígado de color ocre-amarillento aumentado de tamaño con bordes redondeados, riñón de color marrón claro con pelvis ictérica, vejiga llena de orina de color oscuro y edema de vesícula biliar con contenido oscuro y espeso. Microscópicamente el hígado presentaba abundante vacuolización citoplasmática y presencia de hepatocitos pleomórficos multinucleados en proximidades de los espacios lobulillares, con marcada estasis biliar. En la recorrida del campo se pudo observar que el parque del casco del establecimiento poseía una importante y frondosa barrera periférica de arbustos de Lantana. Durante el itinerario se observó que el arbusto invadió las isletas de monte de los potreros lindantes donde pastoreaban los animales, colonizando áreas con ejemplares de más de tres metros de altura.

Discusión y conclusiones

En base al examen clínico, la necropsia, las alteraciones histopatológicas del hígado y la identificaciónde las plantas se concluye que se trató de una intoxicación con *Lantana camara*. El principio tóxico produce lesiones a nivel hepático que impiden que el hígado metabolice en forma adecuada algunos compuestos que a nivel de la piel y en contacto con el sol producen las lesiones de fotosensibilización secundaria o hepatógena. La sustancia fotosensibilizante es la filoeritrina, producto terminal del metabolismo de la clorofila, excretada por la bilis. Si la secreción biliar esta obstruida por hepatitis o por cualquier otra causa que interrumpa el flujo biliar, la filoeritrina se acumula en el organismo hasta llegar a concentraciones en la piel que la hacen sensible a la luz solar, produciendo una dermatitis con desprendimiento de la piel. Es importante tener en cuenta el diagnóstico diferencial con otras malezas hepatotóxicas como son el *Cestrum parqui* (Palque) y *Wedelia glauca* (Sunchillo) muy comunes en la región. Respecto a la invasión y colonización de la Lantana como vegetación arbustiva en el monte ha sido descripta en otras regiones del planeta, especialmente en países del este Africano. En este caso se produjo un verdadero “asilvestramiento” a las condiciones ambientales del monte arbóreo y arbustivo del establecimiento, tornándose tóxica cuando los animales fueron forzados a consumirla por una dieta limitada o cuando se hallaba mezclada con el forraje. La primera medida preventiva tomada en el manejo fue un cambio de potrero limpio y con disponibilidad de sombra, para evitar que los animales sigan consumiendo la planta y se reduzcan los signos dérmicos de la fotosensibilización. En cuanto al control de matorrales bajos de Lantana dentro del monte se realizaron con glifosato 7% o sulfosato al 6 % (con surfactante), aplicado sobre el follaje con mochila motorizada. Para el control de plantas de más de dos metros se sugiere realizar un corte de la parte área de la planta y aplicar aminopiralid al 1% sobre el tocón principal con pincel o en forma líquida.Los resultados de ambos tratamientos generalmente son muy satisfactorios cercanos al 100% de control.

Bibliografía

-Shackleton, R. T.; Witt, A. B.; Aool, W.; Pratt, C. F.(2017). Distribution of the invasive alien weed, *Lantana camara*, and its ecological and livelihood impacts in eastern Africa. African Journal of Range&Forage Science; Issue 1:1-11.

-Caspe, G. (2012). Intoxicación natural en bovinos con *Lantana camara* en la provincia de Corrientes. Ediciones INTA. Noticias y Comentarios. EEA INTA Mercedes (Ctes), Nº 484: 4 pag.

-Marin, R.; Erquiaga, R.; Sernia, C.; Morrel, E.; Scicchitano, S.; Odriozola, E.(2005). Intoxicación natural y experimental de bovinos por consumo de *L.camara*. Vet. Arg. 22(215):332-343.

-Rivero, R.; Gianneechini, E.; Matto, C.; Gil, J. (2011). Intoxicación por *Lantana camara* en bovinos y ovinos en Uruguay.Veterinaria, (Montevideo), 47 (181): 29-34.

Mazzini P. (2014).Control de Lantana. INTA Informa. INTA Río Tercero. Video disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=g0P-WHYhBRA&feature=youtu.be

PT2-CARCINOMA MAMARIO MIXTO MALIGNO Y CARCINOMA INFLAMATORIO: FACTORES PRONOSTICOS

M. Pereira[1]; M. Fidanza[1]; E. Falzoni[2]; V. Micciullo[1].
[1]Cátedra de Patología Clínica y Enfermedades Médicas, Facultad de Ciencias Veterinarias-UBA. Chorroarín 280. CP1427.CABA, Argentina.[2]Cátedra de Enfermedades Infecciosas
*e-mail: mpereira@fvet.uba.ar

Introducción

El cáncer de mama es un padecimiento heterogéneo que requiere de la constante búsqueda e identificación de marcadores. En Medicina Humana y Veterinaria la evaluación de marcadores es de importancia pronóstica. La presencia de receptores hormonales (RE-RP) se asocia a mayor supervivencia y menor posibilidad de recidiva. La sobre-expresión del proto-oncogen Herb2-Neu, la mutación del gen p53 asociado a la expresión de Catepsina D y altos niveles de Ki67, se relacionan a incrementos en las tasas de proliferación, comportamientos más agresivos, independencia hormonal, ocurrencia de metástasis y, en algunos estudios, aumento de la resistencia a la quimioterapia. Por otro lado, el grado de malignidad tumoral, se asocia con la presencia de sustancias procoagulantes capaces de activar la coagulación directamente o a través de respuestas inflamatorias, que favorezcan la segregación de sustancias trombogénicas desencadenando una coagulación intravascular diseminada (CID). El dímero D constituye un factor específico de la actividad fibrinolítica y es un marcador importante de la progresión tumoral, lo que apoyaría el criterio de la relación entre la activación del mecanismo de la coagulación y de la evolución tumoral. La antitrombina (AT) es el inhibidor fisiológico más importante de la coagulación, por lo tanto el descenso de actividad de dicha proteína elevaría el riesgo trombótico.

El objetivo del presente trabajo es la incorporación en Medicina Veterinaria de estos parámetros como factores pronósticos para adecuar el tratamiento en pacientes caninos con carcinoma mixto maligno y carcinoma inflamatorio.

Materiales y métodos

Se trabajó con 40 pacientes caninos con tumores de mama malignos confirmados por histopatología, provenientes del Servicio de Oncología General de la Facultad de Medicina Veterinaria-UBA. Las muestras de tejido mamario fueron fijadas en formalina bufferada al 10% y procesadas por el método histológico convencional. Posteriormente los cortes de 5µm, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. Para la detección de los marcadores las muestras de tejido fueron procesadas siguiendo la técnica de Cell Marque, Rockling, CA, USA utilizando anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ki67 (clon SP6) anti-p53 (clon EP9) y anti-Herb2-Neu (c-erbB-2) (clon CB-11); anticuerpo monoclonal de conejo anti-receptor de estrógenos (RE clon SP1) y anti-receptor de progesterona (RP clon Y85); siguiendo la técnica de Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-catepsina D (D-5). Se evaluaron 3000 células tumorales y se calculó el porcentaje de células con expresión positiva para Ki67, p53, Herb2-Neu, Catepsina D y receptores hormonales sobre el total de células tumorales evaluadas (Tabla). Para las pruebas de hemostasia se utilizó 2 ml de sangre anticoagulada con citrato de sodio al 3,8%. Para la determinación de AT se utilizó un test cromogénico (Coamatic Antithorombin, Chromogenix USA) y para el dímero D un test de aglutinación en látex (Dimertest American Diagnostica, USA). Se realizó un análisis descriptivo de la situación con medidas de posición y con el estudio de las frecuencias de distribución. Se determinó la prevalencia según el tumor (carcinoma mixto maligno y carcinoma inflamatorio). Se analizó la correlación entre los resultados obtenidos de la marcación de p53, Catepsina D, receptores hormonales, Herb2-Neu y Ki67 utilizando el coeficiente de correlación de Spearman, considerándose significativos los p menores o iguales a 0,05.

Tabla

Rango	Reporte	Patrón de Tinción para p53, Catepsina D y receptores hormonales
0	Negativo	Baja positividad: menos del 10%
1	Positivo	Alta positividad: más del 10%
Escala	**Reporte**	**Patrón de Tinción para Herb2-Neu**
0	Negativo	No se observa tinción o la tinción en membrana es en menos del 30% de las células tumorales
1	Negativo	Tinción levemente perceptible en más del 30% de células. Se tiñe parte de la membrana celular
2	Positivo	Tinción leve/moderada de la membrana completa en más del 30% de las células tumorales
3	Positivo	Tinción intensa en la membrana completa en más del 30% de las células tumorales
Rango	**Reporte**	**Patrón de Tinción para Ki67**
1	Positivo	Baja positividad: entre el 11 y el 39%
2	Negativo	Alta positividad: entre el 40 y el 65%

Resultados

Del total (n=40) de muestras histopatológicas de tejido neoplásico mamario canino de tipo maligno, el 12% (n=3/40) presentaron carcinoma mixto maligno y el 8% (n=2/40) carcinoma inflamatorio. En estos pacientes se observó expresión positiva para Herb2-Neu, Ki67, p53, Catepsina D y negativa para receptores hormonales en el total (100%) de casos (n=5/5). También se observó una correlación positiva entre los resultados obtenidos de evaluar la expresión del gen mutante p53, la expresión de Catepsina D, la sobreexpresión de Herb2-Neu y la marcación de Ki67 (p=<0,0001) y una correlación negativa con los resultados obtenidos de la marcación de receptores hormonales (p=0,001). Todos los pacientes evaluados presentaron disminución de la actividad de AT y en cuanto al Dímero D dieron positiva la reacción de aglutinación en látex con una concentración de 200-400ng/ml.

Discusión y conclusión

En concordancia con la bibliografía consultada, se observó en estos pacientes una correlación positiva entre la expresión del gen mutante p53, expresión de Catepsina D y marcación del Ki67. El gen p53 es un regulador negativo del crecimiento celular y presenta un sitio de unión de ADN localizado en la región promotora del gen de Catepsina D. Este hecho indica que la expresión de Catepsina D puede correlacionarse con la expresión de la proteína p53. El antígeno Ki67 identifica células proliferantes y cuanto mayor es la presencia del antígeno Ki67, más agresivo es el tumor, con mayor invasión vascular, posibilidad de metástasis y complicaciones tromboembólicas, mientras que la pérdida de la función supresora del gen p53 activa el crecimiento celular aumentando el riesgo de progresión de la neoplasia sobretodo en asociación a Catepsina D. La evaluación de estos factores pronósticos y su incorporación a los estudios de rutina en caninos con cáncer mamario permitirá implementar medidas preventivas inherentes al tipo histológico del tumor y adecuar la terapéutica tendiendo a una mejor calidad de vida.

Bibliografía

-Andrea G.K.; Marko H.; Branka A.; et. al. (2011): Histopathological evaluation and immunohistochemical study of estrogen receptor α, HER-2 and Ki-67 in canine neoplastic mammary lesions. Veternarski arhiv., 81 (6), 709-722.

Cihan Ay, et. al. (2012). High D-dimer levels are associated with poor prognosis in cancer patients. Haematologica 97(8):1158–1164.

-Klopfleisch R.; Gruber, AD. (2009). Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. Res Vet Sci. Aug; 87 (1):91-6. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.12.01

PT3-EXPRESIÓN DE CATEPSINA D Y SU ASOCIACIÓN A METÁSTASIS EN LOS DISTINTOS TIPOS HISTOPATOLÓGICOS EN CANCER MAMARIO CANINO. ESTUDIO PRELIMINAR

M.E. Pereira[1].; C. Gabriele; J. Artese[1].; A. Vartabedian[1]; E. Falzoni[2]; M.M. Fidanza[1].
1. Área Patología Clínica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA., Chorroarín 280, Buenos Aires, Argentina.
2. Cátedra de Enfermedades Infecciosas
mpereira@fvet.uba.ar

Introducción

En el cáncer mamario canino para evaluar pronóstico y plantear estrategias terapéuticas se requiere, en primer lugar, de un correcto diagnóstico histopatológico. El pronóstico está correlacionado con el nivel de diferenciación. Los tumores malignos con mejor pronóstico son los adenocarcinomas complejos con estructura glandular altamente diferenciada. Los menos diferenciados tienen aspecto heterogéneo y desorganizado. Son los más malignos y se los conoce como anaplásicos, con gran tendencia a invadir vasos linfáticos y sanguíneos. En Medicina Humana la incorporación de marcadores tumorales ha permitido una mejor comprensión de la biología del cáncer mamario, con valor pronóstico y predictivo de respuesta a la terapia. Se ha observado que la Catepsina D se expresa menos en el carcinoma in situ que en el invasor y que por lo tanto estaría relacionada con el carácter invasivo del cáncer y con una mayor tendencia a producir metástasis. Niveles altos de esta enzima se encuentran en un tercio de los carcinomas mamarios en donde su sobreexpresión está asociada con un alto riesgo de recurrencia y baja sobrevida, principalmente por su relación con el compromiso ganglionar. La Catepsina D tiene actividad mitogénica y conduce a proteolisis de membranas basales, favoreciendo la invasión y el desarrollo de metástasis. El objetivo del presente trabajo es investigar la expresión de Catepsina D en cáncer mamario canino, su relación con el diagnóstico histopatológico y la sobrevida global asociada.

Materiales y métodos

Se trabajó con 23 muestras de tejido neoplásico mamario canino de tipo maligno, provenientes del Servicio de Histopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria-UBA. El tipo histológico se determinó por el método histológico convencional. Para inmunohistoquímica las secciones de tejido fueron procesadas siguiendo la técnica de Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-catepsina D (D-5). Las muestras fueron evaluadas a bajo aumento (×40) y luego, para el recuento de células con tinción positiva, a gran aumento (x400). Se evaluaron 3000 células tumorales y se calculó el porcentaje de células con expresión positiva para Catepsina D. Los resultados se interpretaron según tabla

Tabla:

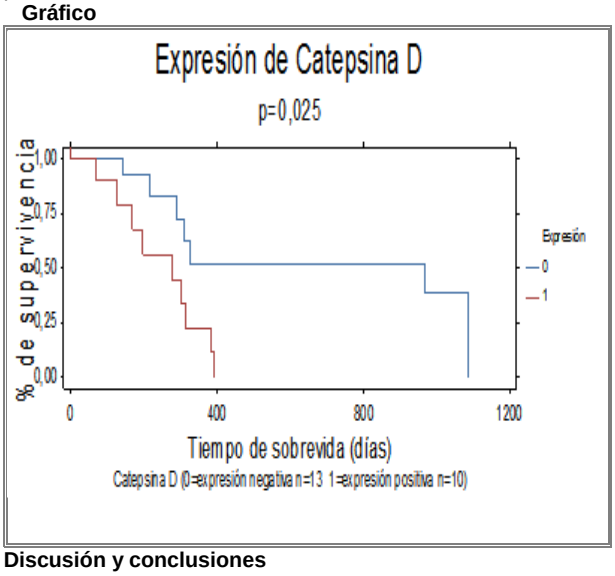
Rango	Reporte	Interpretación: patrón de Tinción para Catepsina D
0	Negativo	Baja positividad: menos del 10%
1	Positivo	Alta positividad: más del 10%

Se realizó un análisis descriptivo de la situación con medidas de posición y con el estudio de las frecuencias de distribución. Para evaluar sobrevida global se empleó el método estadístico de análisis de supervivencia de Kaplan Meier. La comparación entre ellos se realizó mediante el Test de Logrunk y Cox-Mantel, considerándose significativos los p menores o iguales a 0,05

Resultados

Del total (n=23) de muestras histopatológicas pertenecientes a pacientes con tumores mamarios malignos el 43,48% (n=10/23) presentaron expresión positiva para Catepsina D y el 56,52% (n=13/23) presentaron expresión negativa. El grupo de pacientes con expresión positiva para Catepsina D presentó diferencias significativas en relación al grupo con expresión negativa, con una mediana de supervivencia de 280 y 990 respectivamente (p=0,025) (Gráfico). Al relacionar presencia o ausencia de compromiso ganglionar y metástasis con la expresión de Catepsina D se observó que el 70% de pacientes del grupo con expresión positiva para Catepsina D (n=7/10) presentaron compromiso ganglionar y metástasis, mientras que solo el 15,38% de pacientes del grupo con expresión negativa para Catepsina D (n=2/13) presentaron compromiso ganglionar y metástasis. Al relacionar tipo histológico en el grupo con expresión positiva para Catepsina D con compromiso ganglionar y metástasis (n=7) se observó que el 57,14% (n=4/7) de pacientes del grupo presentaron adencarcinoma simple, el 28,57% (n=2/7) presentaron carcinoma mixto maligno y el 14,29% (n=1/7) presentaron carcinoma inflamatorio.

Gráfico



Discusión y conclusiones

En concordancia con la bibliografía consultada, la expresión de catepsina D se asoció a corta sobrevida global, alta capacidad invasiva del tumor dada por su actividad proteolítica y promotora del crecimiento favoreciendo el compromiso ganglionar y la posibilidad de metástasis. La expresión de catepsina D se asoció a los tipos histológicos menos diferenciados, más invasivos y con mayor tendencia a producir metástasis No obstante se requiere de más estudios que involucren un mayor número de pacientes y que validen dichos hallazgos.

Bibliografia

-Dian D.; Heublein S.; Wiest I.; Barthell L.; Friese K.; Jeschke U. (2014). Significance of the tumor protease cathepsin D for the biology of breast cancer. Histol Histopathol, 29(4):433-8.

-Dian D.; Vrekoussis T.; Shabani N.; Mylonas I.; Kuhn C.; Schindlbeck C.; Navrozoglou I.; Friese K.; Makrigiannakis A.; Jeschke U. (2012). Expression of cathepsin-D in primary breast cancer and corresponding local recurrence or metastasis: an immunohistochemical study. Anticancer Res. Mar;32(3):901-905.

-Kadthur S. et. al. (2011). Prognostic Value of Ki 67 Proliferation Antigen in Canine Malignant Mammary Gland Tumours. Braz J Vet Pathol, 4(1),36-40.

-Klopfleisch R.; Gruber, AD. (2009). Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. Res Vet Sci. Aug; 87(1):91-6

PT4- FRECUENCIA DE INMUNOMARCACION NO DESEADA Y SU IMPACTO EN EL DIAGNOSTICO DE ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA

G.Jauregui, G. Francinelli, F. Balbiani, C. Moreno, C. Sanchez, D. Funes, A. Elisei, J. Re, F.J. Blanco Viera, F. Delgado
Laboratorio Nacional de Referencia para las EET, Inst. Patobiología, CICVyA, INTA.
delgado.fernando@inta.gob.ar

Introducción

La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) es una de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET). Estas enfermedades afectan de manera progresiva e irreversible al encéfalo de bovinos, ovinos, cérvidos y humanos, entre otras especies. La EEB es una zoonosis que requiere vigilancia epidemiológica activa. El diagnóstico definitivo de un animal sospechoso se puede realizar, entre otras pruebas, mediante inmunohistoquímica (IHQ). Esta técnica se basa en la detección de la proteína priónica en el Sistema Nervioso Central (SNC) a través de un anticuerpo y un sistema de detección colorimétrico. Un animal es positivo cuando se observa cierto patrón de inmunomarcación en lugares específicos del SNC, como son los núcleos del tracto solitario, dorsal motor del vago y el del tracto espinal del trigémino, presentes en el tronco encefálico. Sin embargo, se ha descripto la presencia de inmunomarcación no deseada o inespecífica de EEB asociada a artefactos de la técnica, reactividad cruzada de los anticuerpos o a la detección de la isoforma celular normal de la proteína. Sin embargo, no se ha notificado la frecuencia de estos eventos.
El objetivo del presente trabajo fue estimar la frecuencia de aparición de inmunomarcación no deseada en muestras de tallo encefálico colectadas para diagnóstico de EEB.

Materiales y métodos

Se analizaron muestras de tronco encefálico de 1000 bovinos, fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina. Secciones de 3 µm de espesor fueron montadas en portaobjetos cargados positivamente, desparafinadas y sumergidas en peróxido de hidrógeno 10% en metanol (30 minutos). Luego se las sumergió en buffer citrato (citrato monohidrato, 10mM, pH 6) y calentó en microondas hasta ebullición por 15 minutos. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario (F99/97.6.1-VMRD), a una dilución 1:4000 en TBST (toda la noche a 4ºC). La presencia del antígeno fue revelada usando el sistema Envision+ Dual Link System (Dako^{r}) y Aminoetilcarbazol (AEC, Dako^{r}) como sustrato cromógeno. Las muestras fueron teñidas con Hematoxilina de Mayer y cubiertas con medio sintético.

Resultados

No se observó inmunomarcación en las zonas blanco de EEB en ninguna muestra. Veintiseis muestras (2,6% de los animales analizados) mostraron coloración no deseada o no específica. De estas, 16 (1,6% del total de animales) fueron por coloración difusa del neuropilo, 7 (0,7% del total) por coloración leve, granular o difusa del citoplasma de algunas neuronas y 3 (0,3% del total) por coloración difusa de la sustancia blanca en el área postrema.

Discusión y conclusiones

Todas las muestras resultaron negativas a EEB. La proporción de animales con inmunomarcacion no deseada fue baja. La misma no respetaba los patrones de marcación descriptos como específicos para EEB, ni involucraba a los núcleos principalmente afectados en esta enfermedad, razón por la cual los animales analizados no pueden considerarse como positivos a la enfermedad. Si bien la inmunomarcación descripta no afectó el resultado del diagnóstico, en algunos casos la misma podría dificultar la lectura de las preparaciones. En ese sentido, la presencia de inmunomarcación no deseada o no específica podría generar confusión en operadores con escasa experiencia.
Algunos patrones de marcación inespecíficos para EEB han sido previamente descriptos para el anticuerpo primario empleado. De los mismos, solo 1 (marcación intracitoplasmática leve y difusa de neuronas) se encontró en las muestras analizadas. De los 2 patrones restantes no se encontraron registros bibliográficos, aunque su aparición fue oralmente notificada por otros investigadores (Stefanie Czub, CFIA, Canadá; comunicación personal).
A pesar de la posibilidad de marcación inespecífica, debido a la baja frecuencia de aparición de los mismos el procedimientode IHQ utilizado resultó confiable. Los resultados obtenidos confirman la importancia de IHQ como método diagnóstico confirmatorio de EEB, debiendo considerarse la posible inmunomarcación inespecífica al momento de emitir un diagnóstico.

Bibliografía

-Organización Mundial de Sanidad Animal. Capítulo 2.4.6. Encefalopatía Espongiforme Bovina. En: Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2015.
-Simmons MM, Spiropoulos J, Webb PR, Spencer YI, Czub S, Mueller R, Davis A, Arnold ME, Marsh S, Hawkins SA, Cooper JA, Konold T, Wells GA. Experimental classical bovine spongiform encephalopathy: definition and progression of neural PrP immunolabeling in relation to diagnosis and disease controls. Vet Pathol. 2011 48, 5:948-63

PT5- ALFA-MANOSIDOSIS EN UN TERNERO ANGUS EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

I. Llada[1*], C. Rial[1], F. Urtizbiria[1], E. Rivera[1], F. Cheuquepan[1], F. Fiorani[1-2], A. Quiroga[3], E.Louge[1], G.Cantón[1]E. Morrell[1], E. Odriozola[1].
[1]INTA, EEA Balcarce.[2]CONICET. [3]UNLP
*eeabalcarce.jefersa@inta.gob.ar

Introducción
La manosidosis es una enfermedad neurológica y letal caracterizada por una excesiva acumulación lisosomal de oligosacáridos ricos en manosa que ocurre como consecuencia de la actividad deficiente de la enzima α-manosidasa. La etiología de esta alteración puede ser adquirida, vinculada al consumo de plantas tóxicas con elevado contenido de swainsonina o tener una base genética ligada a una mutación autosómica del gen MAN2B1. Esta mutación sólo ha sido reportada en las razas Angus, Murray Grey y Galloway. Los signos se hacen evidentes en terneros de 3 a 6 meses de edad, y caracterizados por temblores de cabeza, agresividad si se los perturba y pérdida de estabilidad y coordinación muscular, lo cual los lleva a dificultades para caminar, muriendo finalmente. El objetivo del presente trabajo es describir un caso de α-manosidosis bovina diagnosticado por el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) del INTA Balcarce.

Materiales y métodos
Se reporta un caso en un rodeo de cría, con bovinos Angus, en el partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires (37°52′00″S 58°15′00″O). Se recopiló la información anamnésica y las características clínicas de un ternero de 5 meses de edad que estaba afectado y se procedió a practicarle eutanasia. Se examinó *post mortem* y se extrajeron tejidos que fueron fijados en formol bufferado al 10% para realizar estudios histopatológicos. Muestras del encéfalo fueron procesadas de igual modo y se aplicó una técnica de lectinhistoquímica (LHQ) utilizando las siguientes lectinas biotiniladas: WGA, sWGA, DBA, Con-A, SBA, RCA-I, PNA, LCA, UEA-I y BS-I. Se recorrieron los potreros donde estuvo este rodeo y se recolectaron plantas para su posterior identificación, en búsqueda de aquellas acumuladoras de swainsonina mediante la utilización de claves dicotómicas.

Resultados
El rodeo problema se compone de 85 vacas Angus negro, 2 toros Angus negro y colorado y 68 terneros Angus. Se realizaba entre un 10 y 12 % de reposición anual con animales propios, siendo un rodeo cerrado desde hacía más de 15 años. La alimentación estaba basada en pastizales naturales y pasturas implantadas según disponibilidad forrajera. El ternero afectado había manifestado depresión, anorexia, dificultad para desplazarse, y progresó a un estado de ataxia, parálisis. El curso clínico es crónico y progresivo con una duración de aproximadamente dos meses. En los últimos dos años se había registrado la muerte de 5 animales con igual signología y mismo curso. Durante la necropsia del ternero afectado no se observaron lesiones evidentes. Microscópicamente se observó una vacuolización neuronal multifocal severa con presencia de esferoides en la base del sistema nervioso central, cerebelo y ganglio del trigémino. También se observó vacuolización difusa de células del epitelio tubular renal y vacuolización difusa de hepatocitos. La LHQ mostró una fuerte inmunomarcación en vacuolas intracitoplasmáticas positivas a Con-A y LCA. Ninguna de las especies vegetales recolectadas fueron identificadas como acumuladoras de swainsonina.

Discusión y conclusión
Los hallazgos clínico-patológicos fueron compatibles con una enfermedad de almacenamiento lisosomal. La LHQ mostró marcación a Con-A y LCA, las cuales tienen afinidad con residuos de D-manosa y D-glucosa, lo que permite confirmar el diagnóstico de α-manosidosis. En cuanto a la etiología de esta alteración, la edad de presentación, las particularidades del rodeo y la ausencia de plantas acumuladoras de swainsonina, son evidencias que permiten descartar el origen toxico de la enfermedad. Quedan pendientes resultados moleculares para determinar la presencia de mutación del gen MAN2B1, para confirmar que se trató de la forma hereditaria. de esta enfermedad. Según Tollersrud y col., (1997) se trata de un error autosómico recesivo que, en la raza Angus, corresponde a una mutación en la posición 961 del gen MAN2B1. Esta alteración produce un cambio del nucleótido timina por citosina lo que desencadena un cambio en la síntesis de aminoácidos (Phe321Leu), la alteración en la actividad de la enzima de α-manosidasa, la acumulación de manosa y las alteraciones funcionales y estructurales de los tejidos.
Si bien esta mutación ya ha sido confirmada en bovinos Angus de Argentina nunca fue demostrada en animales que manifestaron signología clínica. También se han descripto cuadros clínico-patológicos compatibles en bovinos de la región. Resta confirmar la etiología de esta patología en Argentina.

Bibliografía
-Berg, T., Healy, P. J., Tollersrud, O. K., &Nilssen, Ø. (1997). Molecular heterogeneity for bovine α-mannosidosis: PCR based assays for detection of breed-specific mutations. Research in Veterinary Science 63(3), 279-282
-Cholich, L. A., Gimeno, E. J., Teibler, P. G., Jorge, N. L., & de Pérez, O. A. (2009). The guinea pig as an animal model for Ipomoea carnea induced α-mannosidosis.Toxicon 54(3), 276-282.
-Giannitti F, Uzal FA, Diab SS, Ortega J, Nordhausen R, Weber N, Gimeno EJ.Alfa-manosidosis en un ternero Aberdeen Angus colorado. VII Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE; 2010).

PT6- BROTE DE FOTOSENSIBILIZACION EN OVINOS DE RIO NEGRO, ARGENTINA

A. Martinez[1*]; C. Lauroua[2]; L. Borrelli[3]; F. Bidinost [4]; C. Robles[1]
[1]Grupo de Salud Animal INTA Bariloche; [2] Residencia Estudiantil UNCPBA; [3] Laboratorio de Microhistología Vegetal INTA Bariloche; [4] Agencia de Extensión Rural INTA Bariloche. martinez.agustin@inta.gob.ar

Introducción. La fotosensibilización es una enfermedad frecuentemente diagnosticada en ovinos que según su fisiopatogenia, puede clasificarse en primaria o secundaria. En América del Sur la mayoría de los casos reportados tienen un origen vegetal por el consumo de plantas como *Ammi majus, A. visnaga* (Apiaceae), *Froelichia humboldtiana* (Amaranthaceae), *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae) que poseen principios fotoactivos (primaria) o por *Tribulus terrestris* (Zygophillaceae), *Panicum sp., Brachiaria sp.* (Poaceae) o pasturas contaminadas con el hongo *Pithomyces chartarum* las cuales poseen principios tóxicos que generan lesiones hepáticas (secundaria). En la Patagonia, si bien es conocida la ocurrencia de la enfermedad, son escasos los brotes estudiados. En este trabajo se presentan resultados preliminares y se discuten posibles causas de un brote de fotosensibilización en ovinos en la provincia de Rio Negro, Argentina.

Materiales y métodos. El brote ocurrió en octubre del 2015 en el paraje Pilquiniyeu del Limay de la provincia de Rio Negro. La zona pertenece al área ecológica de Sierras y Mesetas con un régimen pluviométrico de 150mm anuales. La vegetación corresponde a una estepa graminosa-arbustiva con presencia de humedales. El establecimiento contaba con 55 ovinos hembras Merino, de las cuales 25 habían sido compradas a un establecimiento distante a 500km al Este e incorporadas a la majada en el servicio de ese año. Diez días después de comenzada la parición, el productor observó algunos animales con cambios en el comportamiento, anorexia, irritabilidad, cabeceos exagerados y algunos tenían la cabeza y orejas hinchadas. En la visita al establecimiento se realizó la anamnesis del caso, revisación clínica de animales y toma de muestras de sangre y materia fecal de ovejas afectadas y ovejas no afectadas con el fin de arribar a un diagnóstico. De la sangre se obtuvo suero que fueron analizados para evaluar el perfil hepático (Bilirrubina, AST y GGT). Las muestras de materia fecal se procesaron para evaluar la composición botánica de la dieta mediante técnica microhistológica.

Resultados. Según el propietario, la enfermedad suele ocurrir esporádicamente en la zona con algunos casos mortales. En el presente brote se observó una morbilidad del 9% (5/55) sin mortandad de animales. Todas las ovejas afectadas pertenecían al lote de animales comprados. En cuatro animales clínicamente afectados se detectaron diversos grados de fotofobia, lagrimeo, cierre de los párpados por edema palpebral, edema en orejas, descamaciones y costras en morro y eritema en periné y rodete coronario. En cuatro animales clínicamente no afectados no se observaron las lesiones anteriormente descritas. En dos corderos, uno cría de una oveja afectada y otro cría de una oveja sana, se observó fotofobia, lagrimeo, edema de orejas y eritema en morro. Los valores del perfil hepático se pueden apreciar en la Tabla Nº 1. La composición de la dieta de los animales se puede apreciar en la Tabla Nº 2.

Discusión. Basados en los hallazgos clínicos se concluye que se trataría del primer reporte de fotosensibilización en ovinos Merino en la Patagonia. Si bien no fue posible establecer la etiología ni el tipo de fotosensibilización, se proponen dos hipótesis. La ocurrencia de la enfermedad en las crías sugiere que el tóxico fue excretado por leche y posee acción rápida, tal como ocurre con las furocumarinas y/o antraquinonas que son los principios fotoactivos presentes en plantas que producen fotosensibilización primaria como *Ammi majus, Hypericum sp., Heterophyllaea pustulata*[1].

Tabla Nº1. Valores del perfil hepático de animales afectados y no afectados clínicamente.

Animal	Clinica	BT	BD	AST	GGT
1	Afectada*	7,1	0,9	704	734
2	Afectada	2,2	0,5	521	383
3	Afectada	3,0	0,4	376	387
4	Afectada	2,4	0,4	371	551
5	No Afectada*	2,4	0,5	155	56
6	No Afectada	1,5	0,3	121	70
7	No Afectada	2,0	0,5	211	86
8	No Afectada	2,1	0,3	435	102
Afectadas		**3,7 ± 2,0**	**0,6 ± 0,2**	**493 ± 157**	**513 ± 166**
No Afectadas		**2,0 ± 0,3**	**0,4 ± 0,1**	**230 ± 141**	**78 ± 20**
Valor Referencia		0,1-0,42	0-0,27	60-280	40-94

Ref. BT: Bilirrubina Total; BD: Bilirrubina Directa (mg/ml). AST: Aspartato aminotransferasa; GGT: γ-Glutamiltrasferasa (UI/L). *: Oveja con cordero afectado.

Tabla Nº2. Composición porcentual de la dieta según especies vegetales identificadas.

	Animal								Promedio Dieta	
	Afectados				No Afectados					
Especies (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	Afec.	No Afec.
Poa sp.	21,3	32,5	17,1	16,4	13,5	16,7	24,6	24,0	21,8	19,7
Bromus sp.	24,3	6,0	24,3	20,1	17,1	17,9	18,1	17,2	18,7	17,6
Schismus sp.	5,2	17,3	17,4	20,6	21,0	10,1	16,7	22,7	15,1	17,7
Stipa sp.	6,7	7,4	5,4	5,3	10,2	6,0	6,8	8,1	6,2	7,8
Panicum sp.	7,1	1,8	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	**2,5**	**0,2**
Total gramíneas	**57,7**	**63,3**	**64,1**	**62,4**	**61,9**	**50,7**	**66,2**	**72,1**		
Carex sp.	1,1	6,0	1,2	0,0	0,3	0,0	0,0	0,3	2,1	0,2
Total graminoideas	**1,1**	**6,0**	**1,2**	**0,0**	**0,3**	**0,0**	**0,0**	**0,3**		
Erodium sp.	13,5	11,3	15,0	13,9	11,4	2,1	11,9	3,2	**13,4**	**7,2**
Boraginaceae	1,5	3,2	0,9	1,7	4,5	14,6	3,4	2,3	1,8	6,2
Otras	0,4	1,1	3,9	1,4	0,0	9,6	3,8	0,3	1,7	3,4
Total hierbas	**15,4**	**15,5**	**19,8**	**17,0**	**15,9**	**26,3**	**19,1**	**5,8**		
Ephedra sp.	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	3,6	0,0	0,3	0,0	1,8
Adesmia campestris	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,8	0,3	0,0	0,0	1,3
Junellia sp.	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,7
Schinus molle	0,0	1,4	1,8	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0	0,8	0,6
Total arbustos	**0,0**	**1,4**	**1,8**	**0,0**	**5,7**	**11,0**	**0,3**	**0,3**		
Balanceado	**25,8**	**13,8**	**13,2**	**20,6**	**16,3**	**11,9**	**14,3**	**21,4**	18,4	16,0

La presencia de *Erodium sp.* (Alfilerillo) en la dieta hacen pensar que el origen podría ser primario por consumo de esta planta de comprobada toxicidad en forma experimental[2]. Sin embargo, los valores de la bilirrubina y las enzimas hepáticas elevadas hacen pensar que el origen podría ser secundario. El hallazgo de *Panicum sp.* (Tupo o Ajo macho) en la dieta abonaría dicha hipótesis, siendo que este género es ampliamente conocido como inductor de lesiones hepáticas y consecuente fotosensibilización[3]. Lamentablemente en esta ocasión, no fue posible realizar la histología del hígado para determinar la presencia de lesiones hepáticas. Serían necesarios futuros trabajos para evaluar experimentalmente si el consumo de estas especies antes mencionadas logra reproducir la enfermedad aquí reportada

Agradecimientos: Financiado por SIRSA (Sistema Regional de Salud Animal), PNSA 1115055, Pret 1281102 y Profeder Nº 7889635 del INTA Bariloche.

Referencias.1- Micheloud, JF y col (2017). Spontaneous photosensitization by *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae) in sheep from Northwestern Argentina. Trop Anim Health Prod.49:1553-1556.
2- Stroebel J. (2002). Induction of photosensitivity in sheep with *Erodium moschatum*. South African Veterinary Assoc. 73: 57–61.
3- Riet-Correa, F y col (2009). Sheep poisoning by *Panicum dichotomiflorum* in northeastern Brazil. Pesquisa Veterinaria Brasileira. 29: 94-98.

PT7- DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES EN LECHE DE PRODUCTORES FAMILIARES DE LA PROVINCIA DE MISIONES

E. Sticotti[1]; M. Macció[1]; M. Schneider[1]; C. Rang[1]; E. Rojo[2]; V. García[3]; G. Magnano[1]; A. Macías[1]; J. Giraudo[1]
[1]Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria. (UNRC-FAV) [2]Sub-Secretaría de Agricultura Familiar (SsAF).
esticotti@ayv.unrc.edu.ar

Introducción. La leche puede contener residuos o inhibidores, dentro de estos podemos destacar a los antibióticos (ATBs) comúnmente usados para el tratamiento de mastitis, neumonía, infecciones podales entre otras afecciones. La presencia de residuos de ATBs es un problema que aqueja a toda la industria lechera, ya que representan un problema de salud pública. Se ha determinado que pequeñas fracciones de ATBs en leche, cantidades mínimas como 0.003 UI (unidades internacionales) de penicilina/ ml, pueden afectar a una persona que sea alérgica a dicho fármaco con problemas como ardor en la piel, comezón, asma y shock anafiláctico. Además, existe la posibilidad de generar resistencia de los microorganismos. También, estos residuos provocan perturbaciones pasajeras en la flora intestinal del consumidor y pueden ser la causa de colonización intestinal de bacterias patógenas u oportunistas (Henzenn, 2013).
Estas sustancias no se destruyen con los tratamientos térmicos aplicados en la industria tales como en la pasteurización y la esterilización (Roca et al. 2013), por lo que pueden llegar al consumidor aún después de haber sido sometidas a dichos tratamientos.
Desde el punto de vista tecnológico, estos residuos ocasionan problemas en la fabricación de productos lácteos fermentados, como queso y yogurt (Henzenn, 2013). Su presencia disminuye el ácido y afecta el sabor característico de la manteca.
En nuestro país, según el Código Alimentario Argentino (CAA), se considera leche no apta para ser consumida como tal o destinada a la elaboración de subproductos lácteos, a aquella leche que verifique la presencia de residuos tales como antimicrobianos, antiparasitarios, sustancias químicas, pesticidas, sustancias tóxicas y/o contaminantes.
El objetivo del trabajo es identificar presencia de inhibidores en leche de tanques o tachos, pertenecientes a productores familiares de tres cuencas lecheras de la provincia de Misiones.
Materiales y métodos. En la provincia de Misiones se encuentran productores, que ordeñan y venden la leche y sus derivados directamente al público en Ferias Francas, pequeñas cooperativas o industrias queseras. La mayoría realiza un ordeñe diario, algunos cuentan con máquina de ordeñar. Algunos de estos productores por su ubicación y distancia les es difícil comercializar su producción como leche cruda, por lo cual se transforman en industrializadores de su propia producción, que se comercializa como productos lácteos en el circuito no formal.
En el año 2015 se visitaron 124 tambos familiares en la provincia de Misiones, ubicados en tres cuencas lecheras, (figura 1). Las muestras fueron recolectadas del tacho de ordeñe diario, previa homogenización, con pipetas pasteur y tubos estériles de 10 ml. Los mismos identificados según localidad y productor, y refrigerados hasta su llegada a la Universidad Nacional de Río Cuarto. Las muestras se procesaron en un laboratorio de calidad de leche, y *Delvotest SP-NT* fue el método utilizado para detección de sustancias inhibidores en leche.
Resultados. Las muestras de leche de los 124 tambos resultaron negativas a la presencia de inhibidores, con el método de inhibición microbiológico utilizado.
Discusión y conclusión. Es de destacar la demanda creciente, por parte de los consumidores, de alimentos inocuos y libres de contaminantes (Ruegg, 2003). Esto puede ser un factor de venta y comercialización importante para estos productores.
Consideramos que el bajo grado de intensificación de estos sistemas productivos y la poca utilización de antibióticos para el tratamiento de mastitis puede ser una de las explicaciones de este resultado. Por otra parte la capacitación continua por técnicos de instituciones estatales como SsAF aporta a la correcta utilización y toma de precauciones para evitar los residuos en el tanque cuando se utilizan productos farmacológicos con períodos de retiro conocidos.
Si bien los métodos de inhibición microbiológicos como Delvotest® SP (Altaus *et al*., 2003), y otros utilizados para la detección de residuos de ATBs, no llegan a identificar familias específicas de ATBs (como betalactámicos, tetraciclinas o sulfonamidas) presentando además una sensibilidad limitada para la detección de tetraciclinas en leche, consideramos este resultado obtenido, como muy bueno, ya que proporciona un dato inexistente, favorable para los productores lecheros y, en este caso también, para todos los consumidores que adquieren productos lácteos de la agricultura familiar.
También es el primer diagnóstico que se realiza en estas cuencas lecheras de provincia de misiones, y en este tipo de productores familiares.
Este resultado, sumado a los ya publicados por el grupo de trabajo sobre enfermedades zoonóticas como Brucelosis y Tuberculosis y otras enfermedades como Mastitis, Neospora, Leucosis entre otras, aporta información útil para este sector de la producción agropecuaria.

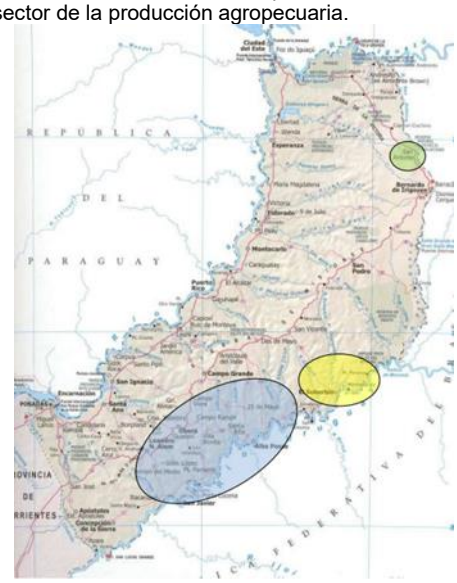


Figura 1: Muestra las tres cuencas lecheras muestreadas

Bibliografía

-Althaus, R.; Torres, A.; Montero, A.; Balach, S. Y Molina, M. P. (2003). Detection Limits of Antimicrobials in Ewe Milk by Delvotest Photometric Measurements. Journal of Dairy Science, 86: 457-463
-Código Alimentario Argentino (CAA) (Ley 18284/69) - Capítulo VIII. Alimentos lácteos. 2011. Disponible en www.alimentosargentinos.gov.ar
-Henzenn, Hilda Inés. (2013). Relevamiento de antibióticos en la leche procedente de pequeños tambos de la región centro de Santa Fe y su relación con la calidad higiénico-sanitaria y factores ambientales. Tesis de maestría en Ciencias Veterinarias. Esperanza. Santa Fe. Argentina.
-Roca, M.; Villegas, M.; Korbitarte, M. L.; Althaus, R.L. Y Molina, M. P. (2013). Thermodynamic Analysis of the Thermal Stability of Sulphonamides in Milk. Journal of Food Chemistry, 136 (2): 376-383.
-Ruegg, P. L. (2003). Practical Food Safety Interventions for Dairy Production. Journal of Dairy Science, 86(E): E1–E9.

PT8- FOTOSENSIBILIZACIÓN EN BOVINOS EN SISTEMAS PASTORILES: ANÁLISIS RETROSPECTIVO (1998-2018)

L. Colque Caro[1*], J. Lobo[1*], I. Llada[1], M. Drake[1], E. Brambilla[1], E. Fernández[1], J. Poo[1], G. Cantón[1], E. Odriozola[1]
[1]INTA, EEA Balcarce.
*eeabalcarce.residsa@inta.gob.ar

Introducción

La fotosensibilización es una dermatopatía provocada por agentes fotodinámicos que se activan en la piel cuando se exponen a radiación ultravioleta (320-400nm) (Haargis & Ginn 2007). De acuerdo al origen del cuadro, puede clasificarse en fotosensibilización primaria (FP), cuando ingresa al organismo un agente fotodinámico preformado. En cambio, se considera fotosensibilización secundaria (FS) cuando una lesión hepática genera la acumulación de sustancias fotoactivas por fallas en su metabolismo hepático, o fotosensibilización congénita por la síntesis de pigmentos aberrantes. Además, se han descripto cuadros de fotosensibilización de origen desconocido (Mauldin & Peters-Kennedy 2016). En los últimos años se han registrado con frecuencia cuadros de fotosensibilización en bovinos en pastoreo, por lo que se realizó un estudio retrospectivo de estos brotes diagnosticados por el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) de INTA Balcarce, entre agosto de 1998 y agosto de 2018.

Materiales y métodos

Se analizaron los brotes con diagnóstico clínico-patológico de fotosensibilización en bovinos en pastoreo, y se los clasificó como FP o FS, teniendo en cuenta diferentes aspectos: signología clínica y patología observada en los animales afectados y determinación de la actividad de enzimas indicadoras de daño hepático (GGT y GOT) mediante espectofotometría en sueros de animales afectados. Con el objetivo de establecer la etiología de estos cuadros, se analizó la información respecto a presencia de especies vegetales en el potrero que los animales pastoreaban que sean fotosensibilizantes primarios o potencialmente hepatotóxicos. También se analizaron los resultados en muestras de material foliar de los forrajes que consumían, para identificar la presencia de hongos, mediante incubación en cámara húmeda durante 10 días a temperatura ambiente y observación de las colonias obtenidas en microscopio óptico (400×). También se analizaron los resultados obtenidos sobre el material vegetal muerto colectado en estos potreros, donde se identificaron y contaron esporas fúngicas.

Resultados

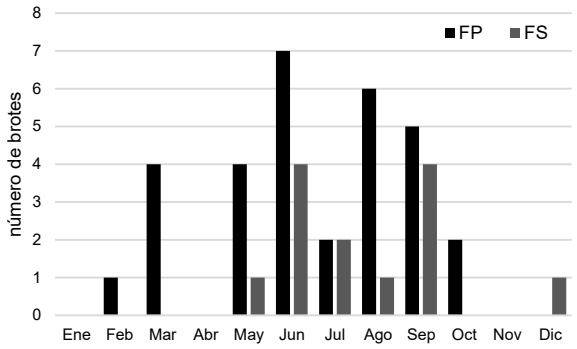
Se registraron 42 brotes de fotosensibilización en el período de estudio mencionado. Ocurrieron con mayor frecuencia entre los meses de mayo y septiembre (figura 1) y se vieron afectados rodeos bovinos de raza Hereford, Angus y sus cruzas. El 31% de los brotes fueron de FP, con ausencia de ictericia y niveles de la actividad de enzimas hepáticas normales. Se caracterizó el 69% de los brotes restantes como FS, detectándose en ellos ictericia (41,4%) y elevación de la actividad de enzimas GGT (89,6%) o GOT (41,4%).

En los brotes de FP, los animales se encontraban pastoreando avena (*Avena sativa*) (38,4%) o raigrás (*Lolium* spp.) (30,7%). En los brotes de FS pastoreaban avena (48,2%) o raigrás (24,1%). En el resto de los brotes de FP o FS no se describió la especie vegetal consumida.

Se detectó la presencia de esporas de *Pithomyces chartarum* en el 61,5% de los brotes de FP y en el 79,3% de los FS, cuyos conteos fueron muy variables por lo que no se pudo establecer una asociación clara entre este hepatotóxico y la etiología. *Dreschlera avenae* estuvo presente en el 23,0% de los casos de FP.

Los signos clínicos manifestados por los animales en los brotes de fotosensibilización, independientemente de su origen (FP o FS) fueron: sacudidas enérgicas de la cabeza (47,6% de los brotes) y epifora (45,2%). Las lesiones se encontraban en regiones de piel clara de la cabeza (90,4%), tronco y extremidades (47,6%). En orden de frecuencia estas fueron definidas como eritema (80,9%), agrietamiento y desprendimiento de piel (54,7%), descamación y costras (73,8%) y necrosis superficial en cara ventral de la lengua (33%).

Gráfico 1: Frecuencia mensual de presentación de cuadros de fotosensibilización primaria (FP) o secundaria (FS)



Discusión y conclusiones

En este estudio se observó que la mayoría de los brotes registrados por el SDVE, en los que se diagnosticó FP o FS estuvieron asociados a pastoreos de avena o raigrás. Al igual que lo mencionado en bibliografía internacional, el patrón clínico y las lesiones macroscópicas son similares para las diferentes formas de fotosensibilización, independientemente si eran FP o FS. El desarrollo de estos signos se atribuye a diferentes compuestos. La esporidesmina, producida por *P. chartarum,* produce la acumulación de fitoporfirinas luego de generar daño hepático (Schild, 1998). El conteo de esporas de *P. chartarum* puede verse afectado altamente por el tiempo transcurrido entre la ocurrencia del cuadro y el momento de muestreo de las pasturas, lo que podría explicar en parte los resultados variables obtenidos en este relevamiento, dificultando establecer esta etiología como causal de los cuadros de FS. Una variedad de cultivos forrajeros, entre ellos, avena y raigrás, se han asociado a casos de fotosensibilización (Fuertes y col., 2004; Capelli y col., 2012). La importancia de estas pasturas en esta patología continúa en estudio, ya que no se ha podido establecer la toxina que provocaría estos cuadros. Se menciona que ante condiciones climáticas inusuales, podrían producir sustancias con capacidad citotóxica para mamíferos. Se deberían realizar más estudios para tratar de confirmar la relevancia de tal asociación y los compuestos responsables de generar estos cuadros.

Bibliografía

Mauldin & Peters-Kennedy. 2016. Integumentary System. In: Maxie MG, ed. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals. 6th ed. Vol. 1. Elsevier, 2016, pp577.

Schild. 1998. Fotossensibilização hepatógena. En: Riet-Correa F, Schild AL, Méndez M del C. Doenças de Rumiantes e Eqüinos. Pelotas, UFPel, p 458-461.

Fuertes et al. 2004. Estudio clínico y lesional de un brote de fotosensibilización ovina de origen hepatógeno en Austrias.

Capelli et al. 2012. Fotosensibilización hepatógena en bovinos pastoreando avena y raigrás. IV Congreso de Asociación Uruguaya de Producción Animal

PT9- DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN RESPONSABLE DE α-MANOSIDOSIS EN BOVINOS CRUZA ANGUS DE ARGENTINA

D. Vilte[1], C. Garro[1], M. Ebinger[2], W. Morris[1], C. Olguin Perglione[3], S. Garbaccio[1], F. Delgado[1]
[1]Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA; [2]Practica privada; [3]Instituto de Virología, CICVyA, INTA.
garbaccio.sergio@inta.gob.ar

Introducción

La α-manosidosis es una enfermedad de almacenamiento lisosomal causada por la acumulación intracitoplasmática de hidratos de carbono, debido a un defecto congénito o adquirido de la enzima α-manosidasa. La forma congénita ha sido descripta para diversas razas. En la raza Angus, ésta ocurre en animales homocigotas que posean una mutación puntual (transición) en el exón 7 del gen que codifica la enzima. Esto produce el cambio de una base T por una C en la posición 961 del gen que sustituye un aminoácido, dando como resultado una proteína defectuosa con actividad nula. Generalmente los terneros afectados no sobreviven al período postnatal, y los que lo hacen muestran enfermedad neurológica progresiva y severa caracterizada por temblores de cabeza, ataxia y agresividad que termina en la muerte.

La α-manosidosis ha sido reportada en bovinos de Argentina. Si bien su diagnóstico puede realizarse por varios métodos, para determinar el origen congénito del cuadro es necesario determinar la homocigocis para el alelo alterado en animales afectados. Por otro lado, para prevenir la aparición de la enfermedad es necesario identificar animales portadores de este alelo. Para ello se requiere de un estudio genético ya desarrollado, aunque no se han encontrado laboratorios que lo realicen en Argentina. El objetivo del presente trabajo fue aplicar un procedimiento previamente descripto para determinar la presencia de animales portadores de la mutación responsable de la α-manosidosis en bovinos cruza Angus de un establecimiento de cría de Argentina.

Materiales y métodos

Se colectaron muestras de pelo de 8 bovinos adultos (6 hembras y 2 machos) cruza de Angus negro y colorado, clínicamente sanos, de un establecimiento de cría ubicado en la provincia de Buenos Aires. En el mismo había notificaciones de malformaciones, muerte perinatal y muerte de terneros con síntomas nerviosos. A su vez, existían antecedentes de α-manosidosis en terneros de 1 año.

El establecimiento era un campo mixto, dedicado a la cría y agricultura. Las vacas se alimentaban de campo natural y una pastura a base de festuca, raygrass y lotus. El servicio era estacionado, y se utilizaba un 3% de toros, alcanzando % de toros de reposición el 80%.

De las muestras colectadas se extrajo ADN genómico de bulbo piloso mediante un kit comercial (ADN Puriprep T-InbioHighway, Argentina) según indicaciones del fabricante, y se amplificó con una polimerasa de alta fidelidad (ACCUZYME DNA polymerase,

UK) una región del gen de la alfa manosidasa (GenBank number AH006593.2 *Bos taurus* lysosomal alpha-mannosidase (ManB) gene) que incluye al exón 7. El producto amplificado fue purificado (ADN Puriprep GP, InbioHighway, Argentina) y enviado a secuenciar (Servicio de secuenciación, Unidad de Genómica IB,-CICVyA, INTA).

Resultados

Se detectó el alelo asociado a la enfermedad y su condición de portador heterocigota para una transición (T -> C) en el exón 7 del gen de la alfa manosidasa lisosómica en 4 animales (1 macho y 3 hembras).

Discusión y conclusiones

La metodología empleada permitió detectar animales portadores del alelo causante de α-manosidosis congénita. La revisión de los registros del establecimiento indicó que al menos 1 ternero nacido como producto de la cruza de los animales identificados manifestó el cuadro clínico y tuvo diagnóstico de la enfermedad, lo cual confirmaría la condición de portadores de los padres.

La portabilidad del alelo causante de enfermedad en los reproductores representa un factor determinante para el desarrollo de α-manosidosis congénita en un rodeo. Sin embargo, debido al carácter recesivo del mismo la prevalencia de la enfermedad suele ser baja. La elevada reposición interna registrada en el rodeo analizado habría favorecido la ocurrencia de la enfermedad, como así también otras malformaciones congénitas.

Si bien α-manosidosis ha sido descripta en Argentina, nunca se determinó el origen genético de dicho trastorno. La metodología empleada en el presente trabajo permitiría confirmar la etiología de casos clínicos y evaluar la presencia del alelo asociado a enfermedad en reproductores, especialmente en establecimientos con elevada consanguinidad en los que se observe enfermedad neurológica fatal esporádica en terneros.

Referencias

-Gianitti F, Uzal FA, Diab SS, Ortega J, Nordhausen R, Weber N, Gimeno EJ. α-manosidosis en un ternero Aberdeen Angus colorado. VII Reunión Argentina de Patología Veterinaria, Bs As, Julio 2010.

-Tollersrud OK, Berg T, Healy P, Evjen G, Ramachandran U, Nilssen O. Purification of bovine lysosomal alpha-mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutations at cause alpha-mannosidosis. Eur J Biochem. 1997 1;246(2):410-9.

- Berg T, Healy PJ, Tollersrud O. Molecular heterogeneity for bovine alpha-mannosidosis: PCR based assays for detection of breed-specific mutations. Res Vet Sci. 1997; 63(3):279-82.

VIROLOGÍA

V1- EVALUACIÓN DE UN ENSAYO DE POLARIZACIÓN DE LA FLUORESCENCIA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ANEMIA INFECCIOSA EN EQUINOS DE ARGENTINA.

A.G. Espasandin [1]; D.E. Martinez[1]; A. Forletti [2]; M.F. Cipolini [1]; J. Soto [2]; C.A. Storani[1]; E. Lucchesi[2]; P. Soto[2]
[(1)] Cátedra Enfermedades Infecciosas, FCV-UNNE, Sgto. Cabral 2139, Corrientes. [(2)]BIOTANDIL (Laboratorio Biológico de Tandil SRL). Montiel 834, Tandil.
demartinez@vet.unne.edu.ar

Introducción

La anemia infecciosa equina (AIE) es una enfermedad causada por un lentivirus (VAIE), que afecta a equinos de todo el mundo. Este virus es transmitido por vectores hematófagos y por vía iatrogénica. En Argentina es especialmente prevalente en las provincias situadas al norte del país, donde los vectores son abundantes en determinadas épocas del año. Existe una legislación vigente (Resol. SENASA 617/05) que establece la lucha contra la enfermedad a través del diagnóstico serológico de los positivos y su posterior eliminación y que establece al Test de Coggins (IDGA) realizado en laboratorios de red como la prueba oficial. En zonas de alta prevalencia se permite la permanencia de equinos positivos a AIE en establecimientos hasta tanto puedan ser eliminados, conformando rodeos con un manejo separado de aquellos que están sanos. Al ser la AIE una enfermedad donde los equinos permanecen infectados de por vida, usualmente los mayores niveles de anticuerpos contra el virus se detectan en animales infectados recientemente, disminuyendo gradualmente a medida que el animal progresa hacia la cronicidad.

La técnica de Polarización de la Fluorescencia permite detectar anticuerpos en el suero de los animales infectados mediante ensayos rápidos y simples. Esta técnica ha sido validada para el diagnóstico confirmatorio de Brucelosis en bovinos (Resolución SENASA Nº 438/2006). El Laboratorio Biológico de Tandil (Biotandil) elabora de manera experimental un kit de FPA para la detección de anticuerpos contra AIE.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar al kit de FPA elaborado por Biotandil como alternativa diagnóstica a la técnica de referencia IDGA empleando sueros de equinos sanos e infectados de Argentina.

Materiales y métodos

Se analizaron un total de 819 muestras de sueros de equinos provenientes de las provincias de Corrientes y Misiones, en el NEA argentino.

El Test de Coggins fue llevado a cabo en todos ellos siguiendo la metodología reglamentada por SENASA (Resolución SENASA N° 617/2005).

El kit de FPA para AIE fue elaborado por Biotandil (Tandil, Argentina). Brevemente, los pasos de esta prueba consistieron en la preparación de 1 ml de Buffer FPA en tubos de borosilicato de 12 x 75 mm, uno por cada suero, incluyendo controles positivo y negativo. Se adicionaron 20 µl de cada suero a testear, se agitaron en vortex. Luego de esperar por 5 minutos se leyó "en blanco" en equipo (Sentry 200 ®). Se adicionaron 20 µl de la dilución de antígeno, se mezcló en vortex y luego de 15 minutos se realizó la lectura final. Los resultados fueron expresados en milipolarizaciones (mP).

Se analizaron los datos obtenidos estadísticamente mediante la estimación de AUC ROC (Area Under Curve ROC – Recievieing Operator Characteristic), medida de la eficiencia global de una técnica (FPA) comparada con otra de referencia (IDGA). Se obtuvo además el índice de Youden, medida estadística que informa sobre el rendimiento de una prueba de diagnóstico. Se estimó el Intervalo de Confianza (IC – 95%) y se analizaron la Sensibilidad (Se) y Especificidad (Sp) diagnósticas utilizando el valor de corte óptimo.

Resultados

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 1. Indicadores del rendimiento de un ensayo de FPA para diagnóstico de AIE en 819 muestras de equinos provenientes de zona endémica de la enfermedad.

Cantidad de Sueros (n)	Punto de corte (mP)	Pos a IDGA (n)	Neg a IDGA (n)	AUC (95%IC)	Se (%)	Sp (%)
819	≥74,4 (IC 95% =72,7a 90,5)	489	330	0,965 (0,950a 0,977)	94,5	95,2

El índice de Youden fue de 0,8963.

En la figura 1 se muestra gráficamente la distribución de los positivos y negativos en función del valor de corte óptimo obtenido en el análisis ROC.

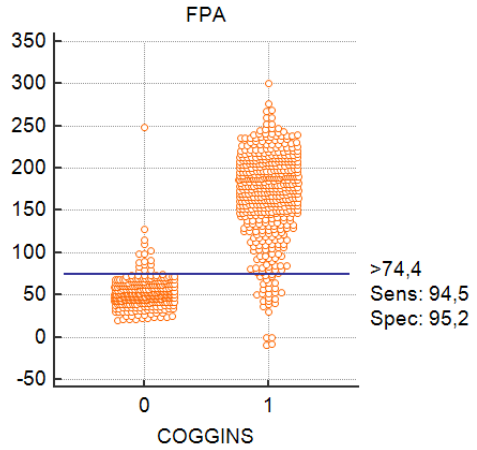


Figura 1. Sueros equinos positivos y negativos a FPA para diagnóstico de AIE, utilizando Test de Coggins como referencia.

*Sueros negativos a IDGA: Coggins=0 y sueros positivos a IDGA: Coggins=1.

Discusión y Conclusiones

Los indicadores de rendimiento de la prueba – AUC e índice de Youden – fueron elevados y la sensibilidad y especificidad diagnósticas obtenidas para la prueba de FPA fueron satisfactorias. La técnica muestra una buena polarización de resultados, con un adecuado agrupamiento de positivos y negativos por encima y debajo del valor de corte respectivamente. Si bien este valor de corte obtenido podría variar en función de incluir en el análisis sueros de equinos que provengan de distintas situaciones epidemiológicas y es necesario analizar un mayor número de muestras para poder concluir definitivamente sobre su valor exacto, el kit de FPA elaborado por Biotandil se muestra como una prueba confiable, rápida y objetiva para el diagnóstico de AIE.

Bibliografía

- Juliarena, M.; Soto, P.; Lucchesi, E. Esteban, E. 2006. Modificación espacial de un péptido sintético para el diagnóstico por FPA de la infección por el virus de la anemia infecciosa equina. Presentado en el III Congreso Argentino de Biotecnología "Biolatina". Ciudad de Buenos Aires, Argentina.
- Nasir, M.S.; Jolley, M.E. 1999. Fluorescence Polarization Assay: An Analytical Tool for Immunoassay and Drug Discovery. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 2: 177-190.
- SENASA. 2005. Programa de Control y Erradicación de las Enfermedades Equinas. Resolución Nº 617/2005.
- Tencza, S.B.; Kazi, R.I.; Vandana K.; Nasir, M.S. Jolley, M.E.; Montelaro, R.C. 2000. Development of a Fluorescence Polarization – Based Diagnostic Assay for Equine Infectious Anemia Virus. Journal of Clinical Microbiology, 38 (5): 1854-1859.

V2- DESARROLLO DE UNA REAL-TIME PCR BASADA EN SYBR GREEN PARA LA DETECCIÓN DE PARVOVIRUS PORCINO Y VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY

C.G. Aspitia[1,2], T. Gilead[1,3], J. Origlia[4], GE. Metz [1,5], MG. Echeverria[1,6], MS. Serena[1,5]
[1] LAVIR-FCV-UNLP, [2] Becaria UNLP, [3] Becario CIN-UNLP, [4] Prof. Adjunto Aves y Pilíferos-FCV, [5] Investigador Asistente-CONICET, [6] Investigador Principal-CONICET. solserena2000@yahoo.com.ar

Introducción

En Argentina como en otros países donde la producción porcina es de importancia, las fallas reproductivas asociadas a causas infecciosas siguen causando problema, sobre todo si no se lleva a cabo un adecuado plan de vacunación. Dentro de los agentes patógenos involucrados, los de mayor impacto en el síndrome de falla reproductiva son los agentes virales, estando presentes en el país el Parvovirus porcino (PPV), el virus de la Enfermedad de Aujeszky (EA) o Pseudorrabia (PRV) y el Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2). El PPV pertenece a la familia *Parvoviridae* y es considerado la causa infecciosa más importante asociada a fallas reproductivas en granjas porcinas. Es un virus ADN de cadena simple y polaridad negativa, de un tamaño aproximado de 5 kb y está ampliamente distribuido tanto en cerdos domésticos como salvajes. El virus de EA pertenece a la familia *Herpesviridae* y su infección conlleva a severas pérdidas económicas en todo el mundo. Es un virus ADN doble cadena cuyo genoma es de aproximadamente 150 kb. La signología clínica asociada a este virus puede ser tanto reproductiva, respiratoria o neurológica.

Como la falla reproductiva en las piaras afecta de manera significativa los beneficios del negocio agropecuario, es importante reducir su impacto. Para esto, es crucial desarrollar una técnica diagnóstica eficaz y rápida para poder cubrir las demandas del sector productivo. Las técnicas moleculares que permiten la detección de genoma son muy usadas para el diagnóstico a nivel mundial. La real-time PCR basada en Syber Green ha demostrado ser una técnica efectiva en la detección rápida y diferencial como así también en la cuantificación de genomas de una gran variedad de patógenos virales.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una técnica rápida, sensible y específica que permitiera detectar e identificar dos de los agentes causales de las fallas reproductivas más importantes del sector.

Materiales y métodos

En primer lugar, se diseñaron pares de cebadores utilizando programas específicos como el DNAman y Primers Express basándose en secuencias reportadas en el Genbank. Los juegos de cebadores fueron diseñados teniendo en cuenta las regiones con menor variabilidad genética de cada virus, y en el caso de EA se tuvo en cuenta la necesidad de lograr una técnica de PCR que permitiera diferenciar entre animales vacunados de infectados. Se diseñaron dos pares de cebadores, un par que amplifica la región gE (ausente en la cepa vacunal) y un par para la región gD. En el caso del PPV se diseñó un par de cebadores que amplifica la región NS1. A partir de células infectadas con las cepas de EA, TL92 y Bartha vacunal e Hipra-PPV, se extrajo el ADN. En primera instancia de pusieron a punto cada una de las técnicas de PCR individual. Se realizaron diferentes pruebas variando las concentraciones de reactivos y modificando los tiempos de extensión de los ciclos de cada etapa de la PCR. Finalmente se logró definir un único programa de ciclado individual para posteriormente ser utilizado en la técnica de multiplex. Para la mezcla de reacción de 25 µl se utilizó 3mM de $MgCl_2$, 0,4 mM de DNTps, 0,2 mM de cada cebador, 7% de DMSO, 1U de TagDNApol y 10% de buffer TagDNApol. El programa de ciclado establecido fue: 95°C 5 min; 35 ciclos de 95°C45 seg, 60°C 45 seg, 72°C 45 seg; y una extensión final de 72°C 7 min. Para la puesta a punto de la técnica multiplex se utilizó el mismo programa de ciclado y se mantuvieron las concentraciones de cada reactivo establecidas. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Para la técnica de real time PCR se llevó a cabo utilizando Syber Green como reactivo indicador empleando dos diluciones en base 10 de cada ADN viral. Las reacciones se realizaron en forma individual y luego en un mismo tubo en forma simultánea se colocó ADN de TL92 y ADN de Hipra-PPV; y en otro tubo se colocó ADN de Bartha vacunal y ADN de Hipra-PPV. En ambos tubos de colocaron los tres juegos de cebadores diseñados (gDm, gEm y PPVm). Las curvas obtenidas fueron analizadas y posteriormente correlacionadas con la temperatura de melting individuales de cada producto amplificado.

Resultados. Tras la reacción de PCR convencional los productos obtenidos fueron 150bp para PPV, uno de 220bp para gD-PRV y uno de 500bp para gE-PRV. Luego de la realización de real time PCR se analizaron las curvas correspondientes a las temperaturas de melting obtenidas. Como se observa en la figura 1, las curvas de las reacciones individuales se condicen con las observadas en la reacción múltiple. La curva de amplificación de la región que codifica para la proteína gE del virus de la EA corresponde a una temperatura de 92˚C, la curva asociada a la proteína gD a 86˚C, y por último a 78˚C podemos observar la curva correspondiente a la amplificación del fragmento NS1 de PPV.

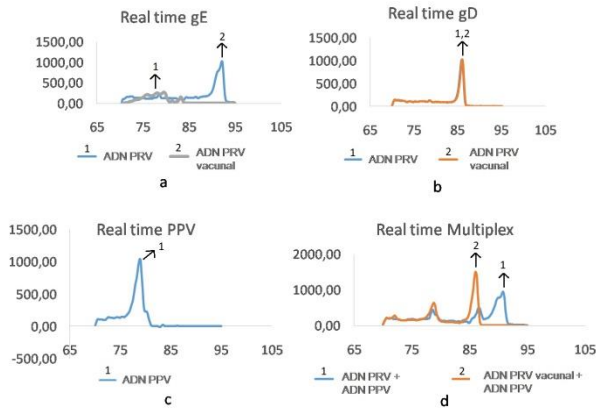


Figura 1: Temperaturas de melting obtenidas en las reacciones individuales y multiplex mediante Real time PCR. a: 92°C gE-PRV; b: 86°C gD-PRV; c: 78°C PPV.

Discusión y conclusión

Si bien quedan detalles para evaluar, la reacción estandarizada es capaz de diferenciar en un único paso la presencia de virus vacunal o virus de campo para el caso de EA y la presencia de PPV. A futuro, la técnica debería evaluarse con muestras de campo para valorar su uso como herramienta diagnóstica. La validación de esta técnica sería muy útil para cubrir los requerimientos del sector productivo, otorgando un diagnóstico rápido y confiable de causas infecciosas de falla reproductiva, a partir de muestras de natimortos o abortos porcinos.

Bibliografia 1-Salogni C y col., Infectious agent identified in aborted swine fetuses in high-density breeding area: a three-year study. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2016, Vol. 28(5) p. 550-554.

2-Zheng L y col., Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 by duplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. Journal of Virological Methods, 2013, Vol. 187 p. 15-19.

3-Perez LJ y col., A multiple SYBR Green I-based real-time PCR system for the simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, pseudorabies virus and Torque teno sus virus 1 and 2 in pigs. Journal of Virological Methods, 2012, Vol. 179 p. 233-241.4-Aspitia y col., Aislamiento y caracterización molecular de Parvovirus porcino en Argentina. Libro de resúmenes del Congreso Argentino de Virologia, 2017, p. 126

V3- TOXICIDAD ASOCIADA A IVERMECTINA EN LA PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN VIRAL EN EL DIAGNÓSTICO DE ARTERITIS VIRAL EQUINA

E.J. Ansiaume[1,4], M.S. Serena[1,4]; M.M Abeyá[1,4], V. Ferreira[2,4], R. López [2,4], P. Trigo[3,4], M.G. Echeverría[1,4], G.E. Metz [1,4]
1-Laboratorio de Virología. 2-Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales del Hospital Escuela. 3- Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Caballo de deporte. 4-Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata
gecheverria@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

La Arteritis Viral Equina (AVE) es una enfermedad de los équidos de gran importancia económica en nuestro país. Es causada por el virus de Arteritis Equina (VAE), virus ARNsc (+) de la familia Arteriviridae, género Equarterivus.
La mayoría de las infecciones ocurridas con el VAE suelen cursar de manera asintomática. Los padrillos infectados pueden transmitir el virus mediante vía respiratoria o venérea y pueden transformarse en portadores crónicos del virus en semen y diseminarlo mediante períodos variables sin intermitencia.
En las yeguas infectadas los mayores problemas ocurren por abortos debido a infecciones en los comienzos de la gestación. Mientras que si la infección ocurre durante estadios avanzados, el virus puede pasar al feto y estos pueden nacer débiles o normales, o manifestar síndrome neumoentérico.
El diagnóstico de AVE se realiza mediante la técnica de Neutralización Viral (NV) empleando una muestra de sangre estéril a partir de la cual se determina el estado serológico de los animales. La presencia/ausencia de efecto citopático (ECP) en la muestra problema indica la ausencia/presencia de anticuerpos específicos para el VAE, siempre comparando con los controles de células (CC) y controles de virus (CV). Sin embargo, en ocasiones existen problemas de toxicidad de la muestra solo evidenciables por comparación con el control de toxicidad (CT) en el cual se incuba el suero problema con las células.
Nuestro objetivo de trabajo es analizar la relación entre la administración de Ivermectina y los efectos tóxicos observados en los ensayos de NV en el diagnóstico de AVE.

Materiales y métodos

Se emplearon 5 animales del Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, siendo 4 de ellos administrados con Ivermectina comercial 1,87% vía oral con una dosis de 0,2mg/kg. El animal 5 que no recibió el tratamiento, se utilizó como control negativo.
Se tomaron muestras de sangre de cada animal previo a la administración de la Ivermectina (t=0), y a las 24hs (t=1), 48hs (t=2), 72hs (t=3), 96hs (t=4), y 1 semana (t=5) y 2 semanas (t=6) post administración de la misma.
Brevemente, y siguiendo las especificaciones del Manual de la OIE, Capítulo2.5.10 referido al diagnóstico de Arteritis Viral Equina, cada una de las muestras en el Laboratorio se desueraron en condiciones de esterilidad y el suero obtenido fue descomplementado a 56°C por 30 minutos. Se sembraron 25 µl de cada uno de los sueros por duplicado y a dos diluciones diferentes (1/4 y 1/8). De igual modo, se realizaron los respectivos controles CC, CV y CT. El resultado del ensayo de neutralización se lee a las 72hs luego de sembrada las muestras.
La toxicidad fue analizada por comparación de la densidad y morfología celular del CT respecto al CC.

Resultados

Los resultados de la siguiente tabla, expresan el porcentaje de monocapa celular afectados por el efecto de la administración de
Ivermectina observados en el pocillo de control de toxicidad en cada una de las diluciones ensayadas.

	Animal 1		Animal 2		Animal 3		Animal 4		Animal 5	
	1/4	1/8	1/4	1/8	1/4	1/8	1/4	1/8	1/4	1/8
t=0, 1, 2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
t=3	0%	0%	60%	60%	70%	40%	40%	20%	15%	0%
t=4	50%	20%	70%	60%	40%	20%	20%	15%	0%	0%
t=5	50%	20%	60%	30%	20%	20%	40%	15%	0%	0%
t=6	50%	20%	70%	50%	60%	40%	45%	20%	0%	0%

Discusión

El manual de la OIE expone la posibilidad de muestras tóxicas en las cuales es imposible establecer su condición de muestras positivas o negativas a bajas diluciones. Trabajos previos han demostrado que el procesamiento de muestras de animales vacunados contra herpes equino genera cierto grado de toxicidad debido a que dicha vacuna es producida con las mismas células que son utilizadas en el ensayo de NV.
Nuestro laboratorio suele recibir muestras tóxicas que en general dificultan pero permiten distinguir el status de dicha muestra. Sin embargo, alguna de ellas poseen una elevada toxicidad por lo cual resulta imposible la entrega del resultado correspondiente.
En general, los veterinarios y/o propietarios de animales a los cuales se les solicitaba nueva muestra, exponían la utilización reciente de diferentes fármacos a los animales siendo los más comunes antiparasitarios de uso rutinario en la industria equina.
Según la farmacocinética y farmacodinamia de la Ivermectina, su concentración máxima en suero se encuentra a las 72 hs post administración y a partir de allí desciende su concentración de manera gradual hasta casi 1 mes de su administración. En este trabajo, encontramos que los mayores efectos tóxicos comienzan a observarse a las 72hs post administración de la droga y a partir de allí se mantiene o desciende la toxicidad en un grado variable. Los grados de variabilidad en la toxicidad observada pueden deberse a: diferencias en las dosis suministradas, vías de administración, metabolismo diferencial entre animales y tiempo post administración en el cual se extrae la muestra problema.

Conclusión

En conclusión, dependiendo de varios factores intrínsecos como las vías de administración, dosis y metabolismo animal, la Ivermectina es uno de los factores que genera toxicidad en los ensayos de neutralización viral para el virus de arteritis equina.

Bibliografía

-Manual de las pruebas de diagnóstico OIE. 2004, 5° Edición. Cap. 2.5.10, pág. 780-792.
-Newton JR, Geraghty RJ, Castillo-Olivares J, Cardwell JM, Mumford JA. (2004). Evidence that use of an inactivated equine herpesvirus vaccine induces serum cytotoxicity affecting the equine arteritis virus neutralisation test. Vaccine. 22(29-30): 4117-4123.
-Pérez R, Godoy C, Palma C, Cabezas I, Muñoz L, Rubilar L, Arboix M, Alvinerie M. Plasma profiles of ivermectin in horses following oral or intramuscular administration. (2003). J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med; 50(6):297-302.

V4- DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR BoHV-1 Y BVDV EN BOVINOS INMUNIZADOS CON VACUNAS REPRODUCTIVAS

J. Soto[1]; S. Perez[2]; E. Lucchesi[1]; A. Forletti; P. Soto[1]
[(1)]BIOTANDIL (Laboratorio Biológico de Tandil SRL). Montiel 834, Tandil. [(2)]Lab. Virología, Dpto. SAMP, FCV-UNCPBA
e-mail: pedrosoto@biotandil.com.ar

Introducción.
El herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) y el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) ocasionan trastornos reproductivos en el ganado. El BoHV-1 se asocia con vulvovaginitis y balanopostitis pustular infecciosa (VPI/BPI), infertilidad, repetición de celo y abortos. El BVDV se asocia con infertilidad, muerte embrionaria, abortos, malformaciones congénitas y muertes perinatales. Contribuye a su persistencia el nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI) (Baker, 1995) que excretan grandes cantidades de virus durante toda su vida, sin presentar signos clínicos de enfermedad. En Argentina, ambos virus son endémicos. La prevalencia estimada es del 90,7% para BVDV y del 84,1% para BoHV-1, en bovinos adultos del sudeste de la Pcia. de Buenos Aires (Odeón et al., 2000). La vacunación es la estrategia de control más difundida para ambas infecciones. Sin embargo, es importante evaluar si la vacunación puede resultar un factor de confusión al interpretar los resultados de las pruebas serológicas durante el diagnóstico de estas enfermedades, particularmente debido a la dificultad para diferenciar animales vacunados e infectados. Los métodos de referencia para el diagnóstico de ambas infecciones son el aislamiento viral y la titulación de anticuerpos neutralizantes, los cuales requieren el uso de cultivos celulares. Debido a los costos de estos ensayos biológicos, se han desarrollado metodologías alternativas más sencillas y rápidas como los ELISA. Por lo tanto, en este trabajo se plantea como objetivo evaluar si el uso sistemático de vacunas reproductivas interfiere en la interpretación de los resultados obtenidos con pruebas de diagnóstico serológico de uso rutinario para BoHV-1 y BVDV.

Materiales y métodos
Vacunas. Se utilizaron dos vacunas comerciales inactivadas que contienen BVDV, BoHV-1, *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter fetus venerealis*, *H. somnus* y *Leptospira sp*.
Diseño experimental. Se utilizaron 21 terneras, serológicamente negativas a BoHV-1 y BVDV, que se asignaron al azar a tres lotes experimentales (7 animales cada uno). Los animales en los lotes A y B recibieron 2 dosis subcutáneas de 5 ml, con 20 días de intervalo, de las vacunas A y B respectivamente. El lote C (control) recibió dos dosis de 5 ml de solución fisiológica estéril. Se obtuvo suero a los días 0, 20, 50, 80 y 132 días luego de la administración de la primera dosis vacunal.
Seroneutralización viral. Para evaluar la presencia de anticuerpos contra BoHV-1 y BVDV se utilizó la prueba de seroneutralización (SNT) en células MDBK. **ELISA.** La detección de anticuerpos para BoHV-1 se realizó mediante un ELISA indirecto y para BVDV mediante un ELISA de bloqueo que detecta anticuerpos dirigidos contra la proteína p80 (Lab. Hipra S. A, España).

Resultados
Al día 0 todos los animales en los lotes A, B y C eran serológicamente negativos a BoHV-1 y BVDV, según los resultados de las pruebas de SNT y ELISA.
Detección de anticuerpos contra BoHV-1 en animales vacunados. Los animales que recibieron la vacuna A, permanecieron seronegativos a BoHV-1 durante todo el período experimental, de acuerdo a la técnica de ELISA o SNT viral. En el lote B, mediante ELISA, se detectó un animal positivo al día 20, aunque la prueba de SNT resultó negativa. En el mismo lote, al día 50 post-vacunación (pv), se detectaron títulos bajos de anticuerpos neutralizantes anti-BoHV-1 en 3 animales (1:16) y 5 animales del mismo lote resultaron positivos por ELISA. A partir del día 80 pv se detectaron 3 animales sospechosos a BoHV-1 por ELISA y 2 animales con bajos títulos de anticuerpos neutralizantes al día 132. No se observó seroconversión.
Detección de anticuerpos contra BVDV en animales vacunados. Mediante ELISA no se detectaron animales seropositivos a BVDV en ninguno de los lotes experimentales. Por SNT se detectó un animal en el lote B con bajos título de anticuerpos neutralizantes (1:8) al día 20 pv. Por la misma técnica, se detectó un animal seropositivo en el lote A y 2 animales en el lote B a partir del día 50 pv, manteniéndose con niveles bajos y constantes a los días 80 y 132 (1:8 a 1:16). No se detectó seroconversión en ninguno de los animales.
Los animales del Lote C, se mantuvieron seronegativos a BoHV-1 y BVDV durante todo el ensayo

Discusión
Tradicionalmente, la respuesta humoral contra BoHV-1 y BVDV se evalúa a través de la prueba de SNT (House y Baker 1971). Esta prueba es altamente específica y más relevante que otros métodos serológicos dado que permite determinar la presencia y concentración de anticuerpos con capacidad de neutralizar al virus. Una limitante es que no permite diferenciar entre la inmunidad humoral por infección y la inducida como respuesta vacunal. En este trabajo, los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos luego de la vacunación fueron bajos y se mantuvieron en esos niveles hasta la finalización del ensayo. En cuanto a la prueba de ELISA es importante tener en cuenta que aporta información sobre la presencia de anticuerpos totales específicos, independientemente de su capacidad neutralizante. En este estudio no fue posible establecer un análisis de correlación entre los resultados del ELISA y la SNT debido a los bajos títulos neutralizantes hallados. La proteína p80 del BVDV, es altamente inmunogénica. Esta proteína la sintetiza el virus cuando se replica, lo que sólo ocurre durante la infección (Raue et al., 2011). Los anticuerpos dirigidos contra esta proteína no son neutralizantes pero pueden detectarse fácilmente por métodos serológicos distintos a la SNT. Como era esperado, mediante el ELISA anti-p80 para BVDV, no se detectaron animales seropositivos post-vacunación. Para BoHV-1 solo se detectaron animales seropositivos en el lote que recibió la vacuna B. Los sueros positivos al ELISA y negativos a la SNT podrían explicarse por la mayor sensibilidad del ELISA. **Conclusión.** Para el caso de BVDV cuando se utiliza un ELISA anti-p80 no existe el riesgo de interferencia de anticuerpos vacunales con el diagnóstico serológico. Para el caso de BoHV-1 ambas técnicas empleadas detectaron animales seropositivos, en mayor proporción mediante el test de ELISA. Se requerirán ensayos experimentales más prolongados para determinar exactamente el momento en el cual los anticuerpos vacunales dejan de ser detectados y validar estos resultados frente a vacunas de mayor poder inmunogénico.

Bibliografía
-Mahecha, F. et al. J Virol Methods. 2011;175(2):228-35.
-Raue R et al. Vet J. 2011 Mar;187(3):330-4.
-Odeón et al. 2000. Rev. Med. Vet. 82: 216–220.

V5- CO-INFECCIÓN DE *TRYPANOSOMA EVANSI* Y EL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EN EQUINOS DE LA PROVINCIA DE FORMOSA, ARGENTINA

E.F. Dubois[1], A.M.Russo[1], A.S.Florentin[1], S.E. Wilkowsky[2], C.M. Monzón[1],
[1]Centro de Investigación y Transferencia (CIT Formosa) CONICET. UNAF, Gobierno de la provincia de Formosa.
[2]Laboratorio de Hemoparásitos, Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar, Buenos Aires.
fernando_dubois@hormail.com

Introducción

El impacto resultante de la interacción entre distintos agentes patógenos en cuanto a la salud del huésped, así como al establecimiento de infecciones subsiguientes, constituye una laguna en el conocimiento de las coinfecciones naturales. La Anemia Infecciosa Equina (AIE) es una enfermedad de considerable importancia para la salud equina debido a sus efectos inmunosupresores y a la anemia severa que deteriora significativamente el rendimiento animal. Es producida por un virus de RNA (VAIE), miembro de la familia Retroviridae, género lentivirus, que afecta a todos los miembros de la familia de los équidos. El *Trypanosoma evansi* (tripanosomas, Kinetoplastida) es un parásito extracelular, hemoflagelado, que pertenece a la sección salivaria. En Argentina se reportaron numerosos casos en la provincia de Formosa en las últimas décadas, atacando principalmente a equinos, produciendo una enfermedad conocida como “Mal de caderas” en relación a la parálisis que produce en el tren posterior de los équidos. Ambos agentes son transmitidos de manera mecánica por grandes insectos hematófagos, incluyendo Stomoxys calcitrans y Tabanus Sp. Además, la transmisión asignada al mal manejo de las agujas contaminadas y otros fómites por parte del hombre, desempeñan un papel importante en la diseminación. El "Mal de Caderas" y la Anemia Infecciosa Equina son enfermedades endémicas en la provincia de Formosa. En esta región, la principal actividad económica es la ganadería extensiva, donde la utilización de los equinos es de extrema importancia en el manejo del ganado. En tal sentido, las infecciones inmunosupresoras y aniquilantes en caballos pueden comprometer drásticamente la economía local. En el presente trabajo evaluamos el impacto de la co-infección por T. evansi y el VAIE en la salud de los equinos expresada a través del hematocrito.

Materiales y métodos

Obtención de muestras: Se realizó el muestreo por conveniencia, no probabilístico (Thrusfield, 2007), Para ello se seleccionaron aquellos establecimientos ganaderos que habían tenido casos clínicos compatibles con enfermedades anemizante. Fueron extraídas muestras de 10 ml de sangre de los equinos mediante punción de la vena yugular y colocadas cada una de ellas en un tubo con y en otro sin anticoagulante (EDTA). Se acondicionaron en conservadoras con refrigerantes hasta su arribo al laboratorio. El diagnóstico de la tripanosomosis se realizó por la técnica serológica ELISA, previamente descripta por Monzón C.M. (2000) y se confirmó la presencia del flagelado mediante la técnica de centrifugación del micro hematocrito (Woo, 1969). En el caso de la AIE, se utilizó la técnica de inmunodifusión en gel de agar (test de Coggins). El volumen de glóbulos rojos expresado en porcentual con relación al total de sangre se cuantifico mediante la técnica clásica del micro-hematocrito (Hto). Los datos obtenidos fueron analizados por el estadístico Kruskal-Wallis con un nivel de significancia del 5%, utilizando el programa Infostat. Para establecer la diferencias se dividio en animales positivos a tripanosomosis, positivos a AIE, positivos (co-infección) y negativos a ambas enfermedades**.**

Resultados

Se obtuvieron 249 muestras de equinos de las localidades de Formosa Capital, Misión San Francisco de Laishí, El Espinillo, Gran Guardia, Portón Negro, Villa General Güemes, Pirané y Misión Tacaaglé. La proporción de animales infectados por AIE y tripanosomosis en todos los establecimientos fue del 67% y 42 % respectivamente. En la siguiente tabla se detallan los resultados al evaluar los Hto.

Tabla: Medias y Desvio Estandar de los Hto en los diferentes grupos.

Grupo	N	Medias	D.E.
T. evansi +	17	32	4,66
AIE+	87	35,22	6,16
Co-infeccion +	78	32,38	6,99
T.evansi - y AIE -	67	35,3	5,22

No hubo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los animales que solamente eran positivos a la trypanosomosis y los que tenían la co-infección y tampoco entre aquellos que eran solamente positivos a la AIE y el grupo que era negativo a ambas enfermedades. Pero si hubo diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre los positivos a la tripanosomosis y co-infeccion con los positivos a la AIE y los negativo a ambas enfermedades.

Discusión y conclusión

En este estudio se asume que la presencia y/o ausencia del VAIE y al *Trypanosoma evansi* son las únicas causas que difiere entre los grupos de animales y que el resto de las causas que intervendrían se distribuyen de igual manera. La alta proporción de infectados observadas, son como consecuencia de su cronicidad en el rodeo. La falta de políticas adecuadas de control y prevención hace difícil revertir esta situación. Según los datos obtenidos, la co-infección produce un mayor decremento del hematocrito en comparación con los animales que tenían AIE y con aquellos que tenían el diagnostico negativo a ambas enfermedades. Sin embargo, no se encontró diferencia con los que solamente tenían el diagnostico positivo de la tripanosomosis. De esta manera se evidencia que la co-infección no produce mayores consecuencias en el hematocrito que la tripanosomosis. Estos resultados coinciden con los publicados por Parreira (2016), de que la inmunosupresión provocada por el VAIE no siempre aumenta la susceptibilidad a otras infecciones.

Bibliografía

1. Monzón C.M. (2000) .Validación de una prueba inmunoenzimática indirecta para la detección de anticuerpos anti-Trypanosoma evansi en equinos de Argentina. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 19 (3), 810-818.
2. Parreira, D. R., Jansen, A. M., Abreu, U. G., Macedo, G. C., Silva, A. R.,Mazur, C.,& Herrera, H. M. (2016). Health and epidemiological approaches of Trypanosoma evansi and equine infectious anemia virus in naturally infected horses at southern Pantanal. Acta Tropica, 163, 98-102
3. Thrusfield M., (2007) . Veterinary Epidemiology. 3rd ed. Edinburgh, UK: Blackwell
4. Woo, PTK, (1970) .The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. Acta Trop. 27: 384–386.

V6- DETECCIÓN DE LOS BIOTIPOS CP Y NCP DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN UN NEONATO BOVINO CON UN CUADRO NEUROLOGICO

E. González Altamiranda[1,2], M. Spetter[1,2], E. Louge Uriarte[2], MR. Leunda[2], S Pereyra[2], E Morrell[2], A. Odeón[2].
1 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; 2 Grupo de Sanidad Animal Área de Producción Animal EEA INTA Balcarce.
galtamiranda.erika@inta.gob.ar

Introducción

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un virus de ARN que pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae.* Genéticamente se clasifica en dos especies principales: VDVB-1 y VDVB-2, las cuales a su vez pueden diferenciarse en los biotipos citopático (CP) y no citopático (NCP), según su efecto en cultivo celular [1]. El VDVB puede infectar al feto, produciendo lesiones y cuadros clínicos variables según la cepa viral, la edad gestacional al momento de la infección y el estado inmunitario de la madre. Las infecciones reproductivas pueden causar mortalidad embrionaria, momificación fetal, abortos, infección persistente (PI, del inglés), nacimientos prematuros y malformaciones congénitas [2]. Los efectos teratogénicos del virus están asociados a infecciones fetales con el biotipo NCP entre los días 79 y 150 de gestación, estando afectado comúnmente el sistema nervioso central (SNC). Las lesiones macroscópicas características incluyen microcefalia, hidranencefalia, hidrocefalia e hipoplasia cerebelar. Por su parte, el biotipo CP del VDVB se aísla típicamente de casos de enfermedad de las mucosas (EM), en los cuales ambos biotipos están presentes de forma simultánea. Generalmente, la EM ocurre en bovinos PI de 6 a 18 meses de vida, producto de una sobreinfección con una cepa CP del VDVB, la cual se origina por una mutación de la cepa homóloga NCP [3].

El objetivo del presente trabajo es describir la coinfección por ambos biotipos del VDVB en un ternero de 1-2 días de vida con signología nerviosa.

Materiales y métodos

Durante agosto de 2013, en un rodeo de cría del partido de Tandil, se registraron nacimientos y muertes de terneros débiles. El rodeo estaba compuesto por 400 vacas (2da. y 3ra. parición) y 75 vaquillonas de raza Hereford. El porcentaje de preñez general fue del 95%. La alimentación consistía de pastoreo en campo natural y verdeos de avena con suplementación a base de maíz. El manejo sanitario incluía la vacunación contra enfermedades reproductivas y diarrea neonatal. Ante los casos de mortalidad neonatal se solicitó asistencia al Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado del INTA Balcarce. Durante la visita al establecimiento se realizó la inspección clínica de una ternera de 1-2 días de vida que se encontraba en decúbito y en estado alerta. A partir de la misma se recolectaron muestras de sangre entera y suero. También se evaluó un ternero de 1 día de vida con signología nerviosa, al cual se le practicó eutanasia y necropsia para buscar lesiones y recolectar muestras para diagnóstico de rutina de muerte perinatal. Las muestras de plasma, leucocitos y órganos fueron procesadas por técnicas virológicas de rutina (aislamiento viral en cultivo celular y seroneutralización). Además, los órganos se procesaron para la detección del VDVB por inmunohistoquímica (IHQ) y se realizó RT-PCR de la región 5'UTR del VDVB en muestras de SNC, bazo, linfonódulo mesentérico, leucocitos y plasma. Los productos de RT-PCR fueron purificados y secuenciados para realizar análisis filogenético.

Resultados

Al momento de la visita, la mortalidad de terneros nacidos débiles alcanzaba un 40% (n=40) de 100 hembras paridas. El ternero sacrificado presentó opistótonos, opacidad corneal bilateral, temblores y debilidad. En la necropsia se observó hidrocefalia, pero no se evidenciaron otras alteraciones en el resto de los órganos. Histológicamente se constató disgenesia de la sustancia blanca y displasia cerebelar.

Se obtuvieron aislamientos NCP del VDVB en plasma de ambos terneros, en tanto que desde leucocitos de ambos terneros y de SNC, bazo y linfonódulo mesentérico del ternero sacrificado se obtuvieron aislamientos CP. En intestino se detectó por IHQ la marcación positiva de células fagocíticas, fusiformes en mucosa. Los análisis de las secuencias nucleotídicas de la región 5'UTR mostraron un 100% de identidad entre los aislamientos NCP y CP de ambos terneros, sugiriendo que ambos corresponderían a una misma cepa del VDVB. El análisis filogenético de ambos aislamientos permitió clasificar a las cepas dentro del subgenotipo 1a y la misma presentó una elevada similitud con las cepas NADL (M31182) (95% de identidad) y Pestivirus 66.3 (AF244967) (99% de identidad); esta última fue aislada de bazo fetal [4]. En ninguno de los terneros se detectaron anticuerpos neutralizantes en suero frente a la cepa NADL (VDVB-1a) y no se detectaron otros agentes infecciosos responsables de pérdidas reproductivas.

Discusión y conclusión

La detección del biotipo CP del VDVB es más frecuente en casos de EM, los cuales se observan principalmente en bovinos PI de 6 a 18 meses de vida. Por lo tanto, la detección de una cepa CP del VDVB en animales de 1-2 días de vida es un hallazgo inusual. Asimismo, las alteraciones del SNC y la opacidad corneal descriptas en este caso son hallazgos característicos de la infección por el VDVB. En este caso, el origen de la cepa CP no pudo determinarse, aunque es probable que haya ocurrido una mutación del biotipo NCP a una edad temprana del ternero. Otro posible origen, aunque menos probable, sería la transmisión de una cepa CP entre un bovino con EM y las hembras gestantes del rodeo, situación que se desconoce. El único antecedente reportado hasta el momento es el aislamiento de un biotipo CP del VDVB en un ternero de 11 días, aunque no se aisló el biotipo NCP como en el presente caso. La ausencia de anticuerpos neutralizantes en ambos terneros sugiere que eran animales PI como consecuencia de una infección fetal temprana. El análisis filogenético permitió clasificar ambas cepas dentro del subgenotipo 1a, previamente descripto en casos de pérdidas reproductivas en el país [4]. Este trabajo demuestra que, ocasionalmente, el biotipo CP del VDVB puede infectar a terneros neonatos. No se pudo establecer una asociación entre las lesiones observadas y el biotipo CP, ya que las mismas lesiones pueden presentarse con el biotipo NCP. Surge como hallazgo destacable la presencia una cepa CP del VDVB en animales a temprana edad.

Bibliografía

[1] Brodersen BW (2014) Vet Pathol. 51(2):453-64.
[2] Baker JC (1995) Vet. Clin. North America 11, 425-445.
[3] Harding y col (2002) Am J Vet Res. 63(10):1455-63
[4] Jones y col (2001) Vet. Microbiol. 81, 367-375.

V7- LEUCOSIS ENZÓOTICA BOVINA. REPORTE DE UN CASO CLÍNICO EN MISIONES

A.J. Pantiu[1]; L. Barbieri[2]; D. Benitez[3]; J. Verón[2]; R. Miño[4].
[1] EEA INTA Montecarlo Centro Regional Misiones. Avenida El Libertador 2472 (3384). [2] AER INTA Oberá Centro Regional Misiones. [3] EEA INTA Mercedes Centro Regional Corrientes. [4] EEA INTA Cerro Azul Centro Regional Misiones.
pantiu.andrea@inta.gob.ar

Introducción

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa, crónica y viral, que afecta al ganado bovino. Es producida por un retrovirus oncogénico del género Deltavirus, subfamilia Oncovirinae, familia Retroviridae conocido por ser un retrovirus tipo C de distribución mundial. La mayoría de las infecciones son subclínicas, pero dentro de los tres años posteriores al contagio alrededor del 30% de los afectados puede desarrollar linfocitosis persistente, y una proporción menor linfosarcomas en diversos órganos (Baruta et al., 2011).

El impacto de la enfermedad radica en la limitación que genera la infección para la exportación de vacunos y la comercialización de semen y embriones, las pérdidas por aumento de los reemplazos, pérdidas de ingresos por decomisos de carcasas a causa de los linfomas, disminución de la eficiencia reproductiva y disminución de la producción de leche (Baruta et al. 2011). El objetivo del presente trabajo fue describir un caso clínico compatible con LBE, en un bovino de biotipo racial Holando (no confirmado mediante pruebas serológicas o aislamiento del virus); así como determinar la positividad de la infección en el rodeo bovino del cual procede el caso descrito.

Materiales y métodos

El caso se presentó en un establecimiento de producción bovina de leche ubicada en colonia Villa Bonita de la localidad de Oberá, provincia de Misiones. El clima de la región es subtropical húmedo, con temperaturas medias anuales del orden de los 21,5ºC; con presencia de heladas invernales y precipitaciones relativamente isohigras del orden de los 1.800 mm anuales. El establecimiento presenta un sistema de producción diversificada, ya que produce leche, utilizando animales biotipo racial Holando argentino, y a su vez se dedica a la producción de yerba mate y te.

Se trató de un animal especie bovina, categoría vaca de 3,5 años de edad, Los principales signos clínicos fueron decaimiento, disminución de la producción láctea, timpanismo, disminución del consumo, pérdida progresiva de peso vivo y muerte del animal. A la necropsia se observó la presencia de nódulos en cavidad abdominal. Como primera medida se realizó tuberculinización mediante la inoculación intradérmica en el pliegue anocaudal interno con PPD a todo el rodeo para descartar Tuberculosis. Luego, se procedió a la toma de muestra de sangre por punción de la vena yugular; de todos los animales del rodeo para su posterior análisis. Las muestras conservadas adecuadamente fueron enviadas al Laboratorio de Virología del Instituto de Patobiologia del INTA Castelar, para detección de anticuerpos anti virus de la Leucosis bovina. Teniendo en cuenta que un factor determinante para el aislamiento viral es la obtención temprana de una muestra adecuada ya que la excreción del virus tiende a ser por pocos días y la concentración de partículas virales disminuye progresivamente con el tiempo; lamentablemente por el estado autolítico de las muestras de órganos no se pudo procesar para determinar aislamiento viral.

Resultados

Los resultados de la tuberculización arrojaron resultados negativos a la prueba de reacción en el pliegue anocaudal interno con PPD para Tuberculosis en todos los animales. Los resultados del análisis de laboratorio realizado a través la técnica de inmunodifusión en gel para la detección de anticuerpos anti virus de la Leucosis bovina de las muestras de sangre enviadas al laboratorio, arrojaron resultados positivos al 80% de los animales muestreados. Cabe destacar que de los animales positivos a LEB, uno de ellos fue el ternero nacido de la vaca que manifestó los síntomas.

Discusión

Luego de evaluar los resultados, determinamos que la sintomatología y evidencias pos mortem de la vaca eran compatibles con Leucosis bovina en la manifestación tumoral característica linfosarcoma, coincidente con sistemas de producción intensiva como el tambo, en el cual generalmente se observa el mayor impacto sanitario y económico de la enfermedad, donde sólo del 0 a 5 % desarrollan la forma clínica de la enfermedad (Díaz Pernea, 2007). Además de los síntomas clínicos generales, podemos decir que el timpanismo se produjo por compresiones de órganos internos, a causa de los linforsarcomas presentes en la cavidad abdominal.

La provincia de Misiones, conserva una alta población rural y una gran cantidad de productores familiares que subsisten en el campo. A este escenario, se suma la creación de las Ferias Francas como alternativa frente a las crisis económicas, donde los productos de la huerta, panificados, leche cruda, derivados y otros, son comercializados directamente a los consumidores (Schneider et al., 2010). Al no haber publicaciones previas sobre prevalencia de LEB en ganado lechero en la provincia de Misiones, esta presentación es el primer reporte registrado, por lo que este diagnóstico inicial nos sirve de base para el desarrollo de nuevas investigaciones que permitan diagramar mejores estrategias de control y a su vez, implica la necesidad de mejorar la escasa información sanitaria regional de las enfermedades bovinas.

Bibliografía

-Baruta, D.A.; Ardoino, S.M.; Brandan, J.L.; Sosa, R.E.; Mariani, E. L.; Albretch, E.M. 2011. Leucosis bovina enzoótica. General Pico, La Pampa. Ciencia Veterinaria. 13 (1): 9-16.

-Díaz Pernea, T. 2007. Leucosis bovina enzoótica (linfosarcoma bovino). Producir XXI, Bs. As., 15(184):36-38.

-Schneider, M.; Magnano, G.; Mació, M.; Sticotti, E.; Macías, A.; Pirogiv, L.; Rang, C.; Bergamo, E.; Gómez, G.; Quinteros, R.; Giraudo, J. 2010. Trayecto, actualidad y proyección de un trabajo interinstitucional en el diagnóstico de brucelosis y tuberculosis en bovinos pertenecientes a productores familiares de la provincia de Misiones. Información Veterinaria, Córdoba, 166:54-56.

V8- LA IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES VIRALES DE LOS EQUINOS PARA LA INDUSTRIA HÍPICA ARGENTINA

A. Vissani[1,2]; C. Olguin Perglione[1]; MS. Tordoya[1]; F Álamos[1]; M. Barrandeguy[1, 2].
1-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Virología, Argentina.
2-Escuela de Veterinaria, Universidad del Salvador, Pilar, Buenos Aires
Email: Vissani.aldana@inta.gob.ar

Introducción
La industria hípica abarca la cría de caballos de distintas razas; los deportes hípicos, y actividades relacionadas, como el trabajo rural y los eventos ecuestres tradicionalistas; así como también las actividades de importación, exportación y faena. La Argentina, se ubica en 1° lugar como productor de caballos de polo y 4° de sangre pura de carrera. Teniendo en cuenta estas consideraciones, las pérdidas económicas debido a problemas sanitarios son una constante preocupación para el sector. Por estas razones, la necesidad de contar con métodos rápidos de diagnóstico, a fin de facilitar el tránsito internacional de caballos como así también instaurar medidas de prevención y control ante brotes de enfermedades infecciosas, han sido decisivos en la adopción de métodos de diagnóstico molecular en laboratorios de todo el mundo.

Objetivo
El objetivo de este trabajo es comunicar los resultados de diagnóstico virológico obtenidos en nuestro laboratorio en los últimos 6 años (2013-2018) y poner en evidencia las ventajas de los métodos moleculares para el diagnóstico de las enfermedades virales de los equinos.

Materiales y métodos
Se utilizaron distintas modalidades de PCR para la detección de genoma viral, siguiendo las recomendaciones de la Organización Internacional de Salud Animal (OIE).
Se analizaron 209 muestras de semen fresco y congelado (importado en pajuelas) por RT-PCR en tiempo real para la detección de Arteritis Viral Equina (AVE); 1252 muestras de hisopados nasofaríngeos (HN) de animales sanos en cuarentena pre-exportación y 217 HN de animales cursando enfermedad respiratoria, por RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de Influenza equina (VIE); 426 muestras de fetos abortados/natimortos y 96 HN de potrillos con enfermedad respiratoria por PCR multiplex para alfaherpesvirus equino 1 (EHV-1) y 4 (EHV-4); y 15 muestras de sistema nervioso central (SNC) y 5 líquidos cefalorraquídeos (LCR) de equinos con enfermedad neurológica mediante RT- nested PCR para la detección de virus del oeste del nilo (WNV) y los virus de encefalitis equina del este y oeste (VEEE y VEEO) Las muestras positivas a EHV-1, se analizaron a su vez por una PCR en tiempo real para diferenciar las variantes neuropatogénica y no neuropatogénicas del virus; y aquellas positivas a VIE se analizaron por una One Step RT-PCR para la detección del fragmento HA1 del gen de la hemoaglutinina, para realizar la caracterización genética del virus.

Resultados
Se detectó AVE en 1 muestra de semen, correspondiente a una partida que se encontraba en la cuarentena previa a la importación. Entre los meses de marzo y julio de 2018, se detectó VIE en HN de animales cursando enfermedad respiratoria aguda, el cual fue caracterizado genéticamente como H3N8, subtipo Florida clado 1. No se detectó VIE en las muestras de HN de animales sanos (1252) en cuarentena pre-exportación. En relación a las muestras de abortos/natimortos, se detectó EHV-1 en el 3,5% (15/426), siendo en todos los casos la variante no neuropatogénica del virus; y EHV-4 en el 21% (20/96) de los HN de potrillos con enfermedad respiratoria. No se detectó virus WNV, ni VEEE/VEEO en las muestras de SNC y LCR analizadas.

Discusión y conclusiones
La implementación de técnicas de diagnóstico molecular para la detección de enfermedades virales de los equinos ha contribuido en la prevención y el control de las enfermedades virales que afectan a esta especie.
De esta manera, en 2017 se logró evitar la utilización de una partida de semen contaminado con el virus de AVE, evitando las grandes pérdidas económicas que esta infección hubiese provocado. Por otra parte, la aplicación de estas metodologías permitió realizar el diagnóstico rápido (24 h) de infecciones virales endémicas (EHV-1, EHV-4 y VIE) que afectan a la producción, facilitando la adopción de medidas de control y prevención. En este punto, es importante destacar que el diagnóstico y la caracterización de VIE durante el brote ocurrido el corriente año en nuestro país favorecieron la inmediata aplicación de medidas de control y también inferir las causas que facilitaron la ocurrencia de un brote de enfermedad en una población de animales vacunados. La aplicación de este diagnóstico fue crítica en relación a la exportación, dado que facilitó la exportación de un gran número de caballos, garantizando la ausencia del VIE en las vías respiratorias, de acuerdo a los requisitos sanitarios de los países compradores.

Bibliografía
Mair, T.S. and Hutchinson R.E. (ed). *Infectious Diseases of the Horse*. Cambridgeshire, Equine Veterinary Journal Ltd, 2009. ISBN 0-9545689-2-3.
OIE. *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals,* 7ma Edición, 2012.
Sellon, D. and Long, M. (ed). *Equine Infectious Diseases.* Missouri, Saunders Elsevier, 2013. ISBN 978-1-4557-0891-8.

V9- DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE ARTERITIS EQUINA EN MUESTRAS DE SEMEN EQUINO EN EL PERÍODO COMPRENDIDO ENTRE LOS AÑOS 2010-2018

C. Olguin Perglione[1], M.A. Vissani[1], O. Zabal[1]; M.S. Tordoya[1], F. Alamos; M. Barrandeguy[1,2].
[1]Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Virología, [2]Escuela de Veterinaria, Universidad del Salvador, Pilar, Buenos Aires.
olguin.cecilia@inta.gob.ar

Introducción

El virus de arteritis equina (VAE), es el agente causal de la Arteritis Viral equina (AVE), una enfermedad respiratoria y reproductiva que afecta a miembros de la familia *Equidae*. La AVE es de denuncia obligatoria en nuestro país y es considerada "notificable" para la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). El curso de la infección generalmente es subclínico, produciendo ocasionalmente abortos, neumonía intersticial y enteritis fulminante en potrillos. En los padrillos puede ocurrir una infección persistente, los cuales se constituyen como reservorio natural del virus, ya que eliminan el virus en el semen. La transmisión se da por vía respiratoria y venérea, durante el servicio natural o la inseminación artificial (IA). Estudios filogenéticos demostraron la existencia de dos grupos: Americano y Europeo, y dentro de este último se distinguen el Subgrupo I y II. El impacto económico de esta infección radica en la necesidad de cancelar eventos por enfermedad respiratoria, la presentación de abortos, el establecimiento del estado de portador en padrillos y las restricciones a las exportaciones impuestas por algunos países para los animales seropositivos.

En nuestro país, todos los padrillos seropositivos al VAE, deben ser evaluados para comprobar que no eliminen virus en semen por medio de la detección de virus en semen por aislamiento viral y RT-PCR. Además, a partir del año 2014, estas dos técnicas son requisito obligatorio para todas las pajuelas de semen importadas al país, quedando las mismas interdictadas por SENASA, hasta que el resultado de laboratorio esté disponible (Res SENASA 617/05 y 9/571/14).

En el primer semestre del año 2010, ocurrió un brote de AVE en Argentina, produciendo abortos, muerte de potrillos jóvenes, infección persistente en padrillos, prohibición del movimiento de animales y cancelación temporaria de la exportación, generando grandes pérdidas económicas. Con posterioridad a este brote, en los años 2010 y 2011, se autorizó la vacunación de padrillos en nuestro país (Res 446 y 520/2010, Res 494/2011).

El objetivo de este trabajo es comunicar los resultados obtenidos en el estudio de detección del VAE en muestras de semen equino en el período comprendido entre enero de 2010 y julio de 2018.

Materiales y métodos

En el período estudiado, se analizaron 389 muestras de semen, de las cuales 164 correspondían a muestras de padrillos dadores de semen y 226 a muestras de semen importado. Además, se analizaron 9 muestras de semen fresco correspondientes a padrillos que se infectaron y seroconvirtieron durante el brote de AVE en el año 2010.

Las muestras fueron analizadas por aislamiento viral en cultivo de células (RK13) y RT-PCR (Nested RT-PCR y RT-PCR en tiempo real). En las muestras en que se detectó VAE, se amplificó y secuenció el fragmento genómico correspondiente al ORF 5 para su posterior análisis filogenético. Estos ensayos fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones descriptas en el Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres de la OIE.

Resultados

En este período, en un 1,8% (7/389) de las muestras analizadas se detectó el VAE por aislamiento viral y RT-PCR. De estas muestras, 3 correspondían a sémenes importados. Uno de estos sémenes, originó el brote de AVE ocurrido en nuestro país en el año 2010. Las otras dos partidas de semen importado contaminadas con VAE fueron detectadas durante la cuarentena. Durante el brote del año 2010, 27 padrillos se infectaron y seroconvirtieron. Dieciocho de estos padrillos fueron retirados de la actividad reproductiva (castrados). De los 9 animales restantes, el 44% (n: 4) permaneció como persistentemente infectado, eliminando el VAE en semen. Tres de estos animales fueron castrados mientras que uno quedó bajo amparo judicial y supervisión de SENASA, imposibilitado de ser utilizado como reproductor, hasta que luego de reiterados análisis se demostró que este animal ya no eliminaba virus en semen. No se detectó VAE en las muestras de reproductores vacunados.

El análisis filogenético de los VAE detectados en el semen produjo el brote en el año 2010 y los sémenes de padrillos persistentemente infectados, agrupan dentro del subgrupo Europeo I, demostrando la relación entre estos virus y los aislados en fetos abortados durante dicho brote. Los VAE detectados en los otros dos sémenes importados agrupan dentro del linaje Americano.

Discusión

La detección del VAE en varias oportunidades en semen congelado importado, pone en evidencia el riesgo de la diseminación de esta infección mediante la inseminación artificial, con las graves pérdidas económicas que esto conlleva. En el año 2010, se pudo confirmar que el importante brote de AVE ocurrido en nuestro país fue producto de la utilización de un semen importado contaminado. Por otro lado, la rápida detección del VAE en una pajuela importada que se encontraba interdictada por SENASA, a principios del año 2017, evitó la presentación de un brote y posterior diseminación de la enfermedad en nuestro país.

Este trabajo, enfatiza la necesidad e importancia de contar con laboratorios con capacidad y experiencia para la rápida detección e identificación de estos agentes tan importantes para la industria equina. Luego de la experiencia adquirida durante estos años, podemos afirmar que los métodos moleculares de detección del VAE (varias versiones de la PCR), son muy confiables siempre que sean utilizados con los debidos controles y por personal calificado. Por otro lado, se pone de manifiesto la importancia de la vigilancia epidemiológica permanente para el reconocimiento inmediato, para que junto a las autoridades sanitarias, sea posible la contención y el control de estas enfermedades y mitigar las importantes pérdidas económicas que ellas producen.

Bibliografía

OIE, *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals,* 7ma Edición, 2016

Timoney PJ. (2007) Infectious diseases and the international movement of horses. In: Sellon, D., Long, M (Eds.), Equine Infectious Diseases, Chapter 69. Elsevier, Philadelphia, USA, pp. 549-556.

Holyoak, G.; Balasuriya, U.; Broaddus, C.; Timoney, P. Equine viral arteritis: current status and prevention. Theriogenology 70 (2008)403-414

V10- DIAGNOSTICO DE ENFERMEDAD DE AUJESZKI EN PORCINOS EN LAS LOCALIDADES DE VINALITO, PALMA SOLA Y SAN PEDRO DE LA PROVINCIA DE JUJUY

M. Larroque[1];A.Valera[2]; C. Cussel[1]; J.Capobianco[1],S. Serena[4], D. Griffo[2] , F. Fabale[2], A. Quiroga [3]; G.Principi[2], A. E. Larssen[2].
1: Dirección Provincial de Desarrollo Ganadero dependiente de la Secretaria de Desarrollo Productivo del Ministerio de Desarrollo Económico y Producción, de la Provincia de Jujuy. 2: Proyecto Tambo y Cerdos Sanos FCV- UNLP. 3: Universidad Nacional de Jujuy. 4: CONICET.
marianalarroque@yahoo.com.ar

Introducción:La enfermedad de Aujeszky es una enfermedad vírica causada por un alfaherpesvirus, con un espectro infeccioso muy amplio. Los cerdos, son los receptores principalescursando la enfermedad de forma generalizada febril con un cuadro de encefalomielitis o de forma latente.
En la Provincia de Jujuy existen aproximadamente 180 establecimientos familiares que crían cerdos (2 a 30 cab),junto a otras actividades agrícolas y ganaderas,concentrados mayormente en la región de valles.
En Julio de 2016 una piara que presentaba lechones con síntomas neurológicos y posterior muerte resulto positiva a Enfermedad de Aujesky.
En la región que concentra el mayor número de productores se desconoce el status sanitario de las piaras con respecto a esta enfermedad y no se incluye la vacunación preventiva en los planes sanitarios implementados.
Con el objetivo de estimar la prevalencia de Aujeszky en la zona para diseñar luego medidas sanitarias acordes a la situación local, se realizó en forma conjunta entre la Dirección Provincial de Desarrollo Ganadero de la Provincia de Jujuy junto a la Facultad de Ciencias Veterinarias de UNLP a través del Programa de extensión “Tambos y Cerdos Sanos” un primer relevamiento serológico de enfermedad de Aujeszky en establecimientos familiares de producción porcina en las localidades de Vinalito, Palma Sola y San Pedro, de la Provincia de Jujuy.

Materiales y métodos: En el mes de Noviembre 2017,se recolectaron 234 muestras de 66 Unidades Productivas distribuidas de la siguiente manera:
Vinalito; 30 UP, 116 muestras, Palma Sola; 21 UP 72 muestras, San Pedro; 15 UP 46 muestras.
Se tomaron muestras de al menos el 20% de los animales en edad reproductiva o destinados a reposición en cada uno de los predios
Las mismas fueron enviadas al laboratorio de Virologia-FCV-UNLP (LAVIR) de la Facultad de Veterinaria de la UNLP.
Para la determinación de anticuerpos contra EA seutilizó la técnica de Virusneutralización (VN) según las especificaciones descriptas en el manual de la OIE. Se utilizó como suspensión viral la cepa TL92 aislada en el LAVIR y células RK13 como sustrato de la reacción,comenzando con una dilución de ½ considerando esta primera dilución como positiva. La lectura se realizó mediante la visualización de ECP.

Resultados:
El resultado de las pruebas serológicas para Aujeszky, en las tres localidades, fue positivo para 18 de los 234 animales muestreados, 7% y en 12 UP 18% encontrándose el mayor porcentaje en la localidad de Vinalito, 75%.

Localidad	Orden	Sexo	Aujeszky
Vinalito	14	Macho	Positivo 1/8
Vinalito	18	Macho	Positivo 1/32
Vinalito	24	Hembra	Positivo 1/32
Vinalito	25	Hembra	Positivo 1/16
Vinalito	26	Hembra	Positivo 1/32
Vinalito	37	Hembra	Positivo 1/32
Vinalito	42	Hembra	Positivo ≥1/64
Vinalito	43	Hembra	Positivo 1/32
Vinalito	46	Hembra	Positivo 1/64
Vinalito	49	Macho	Positivo 1/32
Vinalito	65	Macho	Positivo 1/16
Vinalito	72	Hembra	Positivo 1/8
Palma Sola	148	Hembra	Positivo 1/32
Palma Sola	150	Hembra	Positivo 1/32
Palma Sola	180	Macho	Positivo 1/8
Palma Sola	186	Hembra	Positivo 1/8
Palma Sola	187	Macho	Positivo 1/32
Palma Sola	188	Hembra	Positivo 1/16

Propuesta:
Se continúa trabajando para la realización de un plan de relevamiento serológico intensivo en aquellas zonas muestreadas donde se encontraron reactores positivos a Aujeszky, lo que permitirá delinear políticas de salud animal específicas para el desarrollo local.

Agradecimientos: Municipio de Palma Sola y San Pedro, Técnicos de los Grupos de Abastecimiento Local, Asociación Tierra Fértil y productores locales

Bibliografía:
1. Barceló C., Pipa M. y Huerga I. R. Problemáticas y oportunidades ambientales de la producción porcina familiar Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Centro Regional Santa Fe Estación Experimental Agropecuaria INTA Oliveros Sitio Argentino de Producción Animal. [Online] www.produccion-animal.com.ar . 6/09/2017
2. Beyli, M. E., Brunori, J., Campagna, D., Cottura, G., Crespo, D., Denegri, D., Giovannini, F. (2012). Buenas prácticas pecuarias (BPP) para la producción y comercialización porcina familiar. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Instituto
3. Dibarbora, M., Cappuccio, J. A., Aznar, M. N., Bessone, F. A., Piscitelli, H., Pereda, A. J., Pérez, D. R. (2017). Detección serológica de Brucellasuis, virus de influenza y virus de la enfermedad de Aujeszky en criaderos porcinos familiares de menos de 100 madres en Argentina. Revista Argentina de Microbiología. Volumen 49, (2),158-165.

.

V11- DETECCIÓN Y ESTABILIDAD DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA 1b EN LEUCOCITOS DE BOVINOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS

E. Louge Uriarte[1], M.Spetter[1,2], MR.Leunda[1], S.Pereyra[1], F.Cheuquepán[1], S.Segonds [3], E.González Altamiranda[1,2], A.Odeón[1].
1. Grupo de Sanidad Animal y Residencia Interna en Salud Animal, EEA Balcarce, INTA; 2. CONICET; 3. Actividad Privada.
lougeuriarte.enrique@inta.gob.ar

Introducción

Los bovinos infectados persistentemente (PI) por el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) son la principal fuente de transmisión del virus, manteniendo la enfermedad en los rodeos. Por ello, los programas de control y erradicación de la DVB tienen como principal objetivo la detección y eliminación de bovinos PI. Los objetivos del presente estudio fueron: a) confirmar la condición de PI en bovinos de un campo ganadero; b) detectar el genoma del VDVB en leucocitos de sangre periférica, obtenida de bovinos PI y conservada en diferentes condiciones; c) genotipificar las cepas y evaluar su relación filogenética con cepas argentinas.

Materiales y métodos

El estudio se inició en un campo de cría e invernada (partido de Tandil) con 420 terneros de destete (5-7 meses) y no vacu- nados para el VDVB. Un monitoreo previo por ELISA para anticuerpos (Acs) frente a la proteína NS3 (p80) (INgezim) determinó un 97,6% (41/42) de seropositivos. Dicho resultado sugirió que las respuestas de Acs ocurrieron por infecciones con virus de campo. Asimismo, este hallazgo motivó posterior- mente la búsqueda de terneros PI a los 9-10 meses de vida. Inicialmente, se evaluó la presencia de Ag en biopsias de piel (oreja) (ELISA-Ag) (INgezim) de todos los animales, resultando 7 terneros positivos. A las 4 semanas de obtenido este resul- tado se visitó el establecimiento (mayo de 2018) para recolectar muestras de los 7 terneros y poder confirmar su condición de PI. Las muestras y los análisis realizados fueron los siguientes: a) hisopados nasales (HN) y oculares (HO) en MEM con 2% de antibióticos (MEM+ATB) (GIBCO®), suero y leucocitos de sangre (EDTA) periférica (PBLs), obtenidos con Histopaque (Sigma®), para aislamiento viral (AV) en células MDBK (37 °C, 5% CO_2); se hicieron 4 pasajes sucesivos e IFD (VMRD) para detección del VDVB; b) suero para evaluar anticuerpos neutra- lizantes (AcNs) por el método de virus fijo (cepa NADL) y suero variable; c) PBLs recuperados con Histopaque (Sigma®) y sus- pendidos en TRIzol (Invitrogen) para extracción de ARN, detección y genotipado del virus por RT-PCR anidada y múltiple de NS5B (VDVB-1 y VDVB-2, 360 y 604 pb respecti- vamente).

Por otra parte, las muestras de sangre entera se conservaron durante 24, 44 y 94 h a temperatura de laboratorio (TL) o refrigeradas (RF), para obtener PBLs por centrifugaciones sin gradiente de densidad; los eritrocitos se lisaron (SILE, Inbio Highway) y los PBLs se suspendieron en PBS (pH 7,3). El ARN sólo se extrajo de PBLs de terneros PI (confirmados por AV de suero y/o por RT-PCR para NS5B de PBLs) y se analizó por RT-PCR de la región 5'UTR (288 pb) y por RT-PCR anidada y múltiple de NS5B (límite de detección: 3,7 $TCID_{50}$/ml). Los amplicones del 5'UTR, obtenidos desde PBLs separados con Histopaque, se purificaron (illustra ExoProStar) y secuenciaron (UGB, INTA Castelar) en ambos sentidos (*primers* 324-326). El árbol filogenético se reconstruyó con secuencias de nucleótidos (nt) utilizando el método de neighbor-joining (1000 pseudo-réplicas) y el modelo evolutivo K2P+G (MEGA7); se inclu- yeron cepas argentinas y del resto del mundo, representativas de los subgenotipos de BVDV-1.

Resultados

El HN de T1 y los sueros de T1 y T4 resultaron positivos al AV e IFD (VDVB ncp); las otras muestras fueron negativas a esta técnica. Los terneros T1, T3, T4 y T6 se mantuvieron seronega- tivos para AcNs, mientras que los terneros T2, T5 y T7 desarrollaron bajas respuestas de AcNs (1:8 a 1:16). Los sue- ros y PBLs de T1 y T4 resultaron positivos a la RT-PCR anidada de NS5B, mientras que únicamente los PBLs de T3 resultaron positivos (suero negativo); en todas las muestras se identificó VDVB-1. Los resultados de sueros y PBLs de T1, T3 y T4 también se confirmaron por RT-PCR del 5'UTR. El HN de T4 fue positivo a la RT-PCR de NS5B, mientras que los HN e HO de T1 y T3 fueron negativos. Los resultados obtenidos indicaron que T1, T3 y T4 fueron terneros PI. La detección genómica del VDVB-1 (5'UTR y NS5B) en PBLs de sangre de bovinos PI, conservada bajo diferentes condiciones, se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Amplificación de 5'UTR y NS5B del BVDV-1 en PBLs de sangre conservada a distintos tiempos y condiciones.

Animal	Tiempo (h)	Conservación	5'UTR	NS5B
1	24	TL	+	+
	44	TL	+	+
	94	TL	+	+
	24	RF	+	+
	44	RF	+	+
	94	RF	+	+
3*	24	TL	neg	neg
	44	TL	+d	neg
	94	TL	neg	neg
	24	RF	+d	+d
	44	RF	+d	neg
	94	RF	+d	+
4	24	TL	+	+
	44	TL	+	+
	94	TL	+	+
	24	RF	+	+
	44	RF	+	+
	94	RF	+	+

*Muestra de suero negativa; TL°, temperatura de laboratorio; RF°, refrigerada en heladera

Las secuencias de nt del 5'UTR (nt 112-376, cepa NADL) de T1 y T4 mostraron 100% de identidad, sugiriendo que la cepa sería la misma. La cepa SGT1 agrupó con cepas argentinas del subgenotipo 1b y mostró una relación filogenética cercana con cepas (09-165 y 09-792) aisladas de bazo y sangre de bovinos con enfermedad de las mucosas.

Discusión y conclusiones

Aunque las técnicas de diagnóstico utilizadas en ambos mues- treos fueron diferentes, los bovinos PI suelen ser positivos al AV y RT-PCR de PBLs cuando previamente resultaron positivos al ELISA-Ag o IHQ de piel [1]; este hallazgo se observó en T1 y T4. Por otra parte, parece poco probable que los teneros T2 y T5 a T7 hayan desarrollado infecciones agudas. La proporción de bovinos positivos al ELISA-Ag de piel y negativos a otras técnicas (AV y RT-PCR de PBLs), evaluadas en el mismo momento o luego de 90 días, suele ser relativamente bajo (≈ 12%) [1]. En el presente estudio se detectó un ternero PI con resultados negativos en suero (AV y RT-PCRs) y positivos en PBLs (RT-PCRs). Este tipo de bovinos PI ha sido reportado por otros investigadores [2;3] cuando compararon el AV desde suero y PBLs. Por lo tanto, estos bovinos PI representan un desafío real para los programas de control de la DVB. Sin embargo, el presente estudio demostró que la sangre entera de bovinos PI, conservada en refrigeración durante un período de hasta 94 h, permite detectar genoma del VDVB en PBLs utilizando RT-PCRs convencionales. Por lo tanto, la demora en la llegada de la sangre al laboratorio no sería una limitante para esta técnica, pero es conveniente conservarla refrigerada. La pérdida de cadena de frío podría afectar la detección genómica del VDVB en PBLs de ciertos bovinos PI (negativos en suero).

Bibliografía

[1] Cornish y cols (2005). J. Vet. Diag. Invest. 17, 110-117.
[2] Brock y cols (1998). J. Vet. Diag. Invest. 10, 22-26.
[3] Grooms y cols (2001). J. Am. Vet. Med. Assoc. 219, 629–631.

V12- EVALUACION DE UN "KIT" DE ELISA COMPETITIVO CONTRA LA PROTEINA 26 DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

A. Vissani[1,2]; Z. Hu[3], XJ. Wang[3], I Alvarez[1,4]; T. Becú[5];; M. Barrandeguy[1, 2].
1-Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar; 2-Escuela de Veterinaria, Universidad del Salvador, Pilar, Buenos Aires; 3-Harbin Veterinary Veterinary Research Institute (HVRI); China; 4- CONICET, Argentina; 5- Clinica Equina, Capitán Sarmiento, Buenos Aires
Email: vissani.aldana@inta.gob.ar

Introducción

La Anemia Infecciosa Equina (AIE), causada por un virus de la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*, afecta a miembros de la familia *Equidae* y presenta distribución mundial. La enfermedad se caracteriza por episodios febriles recurrentes, trombocitopenia, anemia, pérdida de peso y edema de las partes bajas del cuerpo. Si el animal no muere luego de la fase clínica aguda, se desarrolla un estadio crónico y el animal queda infectado de por vida. La infección también puede ser asintomática, y por lo tanto inaparente. El período de incubación es, generalmente de entre 1 y 3 semanas, pero puede prolongarse hasta 3 meses. La transmisión se produce por insectos hematófagos, principalmente tábanos (*Tabanus fuscicostatus hine*) y mosca brava (*Stomoxis calcitrans*) y por vía iatrogénica (reutilización de agujas y otros elementos), a partir de los animales infectados.

El diagnóstico etiológico se realiza de forma indirecta, mediante la detección de anticuerpos séricos. Las técnicas recomendadas por la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE) son la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y los enzimoinmunoensayos (ELISA). El antígeno que se utiliza para la IDGA es la proteína estructural interna del virus, p26, la cual es más conservada en distintas cepas del virus que las glicoproteínas gp45 y gp90. En nuestro país, la técnica implementada tanto para los controles obligatorios así como también para las importaciones/exportaciones es la IDGA. Sin embargo, otros países exigen como requisito para la importación de caballos el resultado negativo por la técnica de ELISA.

Objetivo El objetivo de este trabajo fue evaluar un ELISA competitivo (cELISA) desarrollado por el "Harbin Research Institute" (China), como metodología complementaria para el diagnóstico de AIE.

Materiales y métodos

Muestras

Se utilizaron 183 muestras de suero, de las cuales 45 correspondían a un panel de proficiencia otorgado por el "Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety" (ANSES), Francia, 135 a equinos de distintas regiones de nuestro país (Buenos Aires, Corrientes y Santa Fé) y 3 provenían de un mismo animal (a distintos tiempos) que presentaba resultados de AIE discordantes (negativo IDGA/ positivo cELISA) durante la evaluación previa a la venta del mismo.

Metodología

Todas las muestras fueron analizadas por la técnica de IDGA AIE INCUINTA (INTEA, Argentina) y por un cELISA anti-p26 del virus gentilmente cedido por el Dr Xioajun Wang del "Harbin Veterinary Research Institute" (HVRI) de China.

Las muestras correspondientes al panel de proficiencia, así como todas aquellas que mostraron resultados discordantes, fueron analizadas por la técnica de cELISA (IDEXX, USA) anti-p26 y las 3 muestras correspondientes al mismo animal fueron también analizadas por la técnica de western blot contra la p26.

Resultados

Los resultados obtenidos por IDGA y cELISA (HVRI) de las 183 muestras de suero, se detallan en la Tabla 1.

De las 8 muestras negativas por IDGA y positivas por el cELISA en estudio (HVRI), el 50% (4/8) resultaron también positivas por el otro "kit" de cELISA (IDEXX).

Sólo un animal, del que se habían obtenido 3 muestras, resultó negativo a IDGA y al cELISA en estudio (HVRI), pero positivo al cELISA de IDEXX. Estos sueros resultaron negativos a la técnica de western blot.

Tabla 1: Concordancia entre las técnicas de IDGA y cELISA (HVRI) para la detección de anticuerpos contra AIE.

		IDGA		
		Positivo	**Negativo**	**Total**
cELISA (HVRI)	**Positivo**	133	8	141
	Negativo	0	42	42
	Total	133	50	183

k: 0,884 (concordancia muy buena); DE: 0.04;
95% IC= 80,6-96,2%
Sensibilidad: 100% ; Especificidad: 84%

Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos con el "kit" cELISA del HVRI, tuvieron una concordancia muy buena (k:0,884) con los de IDGA. La alta sensibilidad del cELISA (100%), al igual que la descripta para otros ELISAs, sumado a la rapidez del diagnóstico (máximo 2 h), evidencia las ventajas de esta metodología para el diagnóstico rápido de AIE. Sin embargo, como la especificidad no es del 100%, los reactores positivos deben ser confirmados por la técnica de IDGA, para un diagnóstico definitivo. Los resultados obtenidos también demuestran que los animales negativos por ELISA (tal como se ha descripto para otros ELISA´s) son verdaderos negativos para la infección con el virus de AIE.

Puntualmente, los resultados relacionados con el animal en evaluación de preventa, ponen en evidencia que la confirmación de un resultado positivo por ELISA, mediante la IDGA y/o el western blot, es muy necesaria, sobre todo en équidos que no tienen relación epidemiológica con animales infectados con el virus de la AIE (tal el caso del animal en preventa incluido en este trabajo). En este caso, tras un diagnóstico positivo por cELISA a AIE pero negativo por IDGA, en un animal de polo de la zona de Pilar, provincia de Buenos Aires, sin ninguna relación epidemiológica con casos de AIE, fue necesario obtener nuevas muestras (a distintos tiempos) para descartar que se tratara de un animal en período agudo de la infección, con bajos niveles de anticuerpos, o de un "falso positivo". Fue necesario también recurrir a otras herramientas diagnósticas, como "western blot", PCR y el ELISA del HVRI para dilucidar la verdadera situación de este animal respecto de la infección con virus de la AIE. Este evento, puso en riesgo la venta de 14 animales (grupo en el que se encontraba el animal en cuestión), incrementando los costos de diagnóstico y los tiempos de espera para que esta operación comercial se concrete.

Para finalizar, la AIE sigue siendo una enfermedad de importancia económica significativa para la industria hípica argentina. Durante los últimos años, la prevalencia de la infección se ha incrementado en la región del centro del país, zona de cría de caballos deportivos. Recientemente, caballos de la región patagónica (declarada zona libre del virus) han resultado positivos al diagnóstico por IDGA de AIE. Esto remarca la importancia, no sólo del diagnóstico, sino también de la implementación de políticas de control y erradicación para evitar la diseminación por todo el territorio nacional (incluyendo zonas de importancia económica para la industria).

Bibliografía

- Equine Infectious Anemia (2014). En: Equine Infectious Diseases, 2nd Edition Eds D. Sellon and M Long. Capítulo 23.
- OIE. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, 7ma Edición, 2013, Capítulo 2.5.6

V13- UTILIZACIÓN DE TESTS CROMATOGRÁFICOS PARA LA PESQUISA DE CHLAMYDIAS EN AVES COMERCIALIZADAS EN LA FERIA NUEVA POMPEYA

A. Petta[1]; M. Rossano[2]; G.N. Vilar[2]; M. Martínez Vivot[2]
[1]Hospital Escuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.[2]Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.
drpetta@yahoo.com.ar

Introducción

La psitacosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por *Chlamydia psittaci (C. psittaci*), una bacteria intracelular (1). Su reservorio principal son las aves y su mecanismo de transmisión es por contacto directo o por inhalación de secreciones respiratorias o heces secas de aves infectadas (2). Las personas con exposición ocupacional o recreativa a distintas aves tienen mayor riesgo de infección (3). Suele presentarse de forma esporádica, pero puede darse en brotes (2). La presentación varía desde infección subclínica hasta sepsis grave y afectación multisistémica. En las aves se puede presentar con una sintomatología variable (portación asintomática, signos sistémicos por serositis fibrinosa, cuadros granulomatosos, necrosis proliferativa tisular), siendo los cuadros respiratorios y digestivos los más habituales (4).

En el contexto de la regulación de la actividad de la Feria de Nueva Pompeya (que desde 1904 es un exponente de la venta de diferentes especies animales), por parte del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, se lleva a cabo el control veterinario de las aves que serán comercializadas. Las mismas pertenecen a criaderos con una economía de subsistencia. El procedimiento de control consiste en una selección de las aves que clínicamente se encuentran aptas para la venta a particulares. Luego de esta primera selección y a pedido del Gobierno de la Ciudad, se debe realizar una prueba etiológica a un 5% de las aves de cada puesto de venta (en la actualidad 14) para la detección de *Chlamydia*. La prueba que mejor se adapta a las exigencias de control, tiempo y viabilidad como costo de producción es la cromatografía. Otras pruebas como la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) resultan imposibles de aplicar por su alto costo y tiempo de procesamiento, mientras que la citología, económicamente accesible, es inconveniente en cuanto a sensibilidad, especificidad y tiempo de procesamiento. En el caso que resultasen animales positivos, los mismos deben ser sacrificados. Luego se testea el lote, que no estuvo incluido en el primer muestreo del 5%, con tests cromatográficos y se envía una muestra de entre el 5 al 10 % del lote para realizar un estudio por PCR. Todos los animales de dicho lote son tratados y retesteados dos veces en un lapso de 3 meses pudiendo volver a la venta en caso de resultar nuevamente negativos. El **objetivo** de este trabajo fue realizar un refuerzo diagnóstico para esta enfermedad zoonótica con un test de detección rápida de antígeno.

Materiales y métodos

En el estudio realizado se muestreó el 5% de las aves que ingresaron a la feria Nueva Pompeya durante los meses de noviembre 2017 a junio 2018. Se muestrearon 1200 animales y la toma de muestra fue hisopado cloacal o conjuntival.

Las especies que se muestrearon fueron: Canario (*Serinus canaria*), Manon (*Lonchura striata domestica*), Calafate (*Lonchura oryzivora*), Diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*), Diamante de gould (*Chloebia gouldiae*), Diamante descollado (*Amadina fasciata*), Star Finch *(Neochmia ruficauda*), Diamante buteler (*Stagonopleura Guttata*), Cocotillas (*Nymphicus hollandicus*), Cotorras australianas (*Melopsittacus undulatus*), Rabadillas (*Psephotus haematonotus*), Rosellaseximius (*Platycercus*), Pericos de bourque (*Neophema bourkii*) y Kākāriki (*Cyanoramphus auriceps*). Las muestras fueron procesadas utilizando dos tests cromatográficos de detección rápida de antígeno de *Chlamydia trachomatis*, como prueba etiológica (Montebio Chlamydia y Chlamy check 1 strip). Los mismos se fundamentan en la detección cualitativa de antígenos del Lipopolisacárido (LPS) de membrana de la *Chlamydia* mediante un anticuerpo monoclonal. Estos antígenos poseen reacción cruzada con los LPS de *Chlamydia* (la prueba no distingue entre *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae o Chlamydia psittaci*) y otras bacterias Gram negativas, lo que justificaría su uso en las circunstancias descriptas. Los test proveen todos los elementos necesarios para la toma de muestra y posterior procesamiento (muy sencillo) y el tiempo de lectura una vez colocada la muestra preprocesada en el mismo es de 20 minutos. Los kits fueron probados con aves positivas a *C. psittaci* mediante PCR, siendo los resultados a los kits también positivos.

Resultados

Todos los animales muestreados resultaron negativos.

Discusión y conclusión

Los resultados revelan una relación directa entre el buen estado clínico y la negatividad de los tests.

Resulta interesante la utilización de un test rápido que se adapte a un contexto socioeconómico y comercial particular. La decisión de elegir el test que se utilizaría para este trabajo, en vista de la existencia de otros más específicos y sensibles, se llevó a cabo mediante la interacción entre el Gobierno de la Cidad y el veterinario a cargo del procedimiento de control. Considerando que los animales testeados pertenecían al grupo de admitidos clínicamente, la expectativa pretest fue que las mismas resultasen negativas al mismo. Por otro lado, llevar a cabo esta prueba permite la investigación de carácter exploratoria sobre la portación asintomática de este agente zoonótico en población de aves comercializadas.

Para prevenir esta zoonosis, se recomienda no capturar aves y pájaros silvestres, ni comprarlos en la vía pública o ferias sin certificado sanitario, de ahí la importancia de utilizar los tests etiológicos rápidos de cromatografía para tal fin.

Bibliografía

1. Knittler MR, Sachse K. *Chlamydia psittaci*: update on an underestimated zoonotic agent. Pathog Dis. 2015;73:1–15.
2. Petrovay F, Balla E. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*. J Med Microbiol. 2008;57 Pt 10:1296–8.
3. Chau S, Tso EY, Leung WS, Fung KS. Three cases of atypical pneumonia caused by *Chlamydophila psittaci*. Hong Kong Med J. 2015;21:272–5.
4. Poultri disease sixth edition. © 2008, Elsevier Limited. All rights reserved. ISBN: 978-0-7020-2862-5

V14- LEUCOMETRÍA EN BOVINOS INFECTADOS Y NO INFECTADOS POR EL VIRUS DE LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA

F. Tello Delía[1], M. Macio[1], G. Magnano[1], E. Sticotti[1], A. Macias[1], M. Schneider[1], J. Giraudo[1].
[1]Universidad Nacional de Rio Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC-FAV).
facutellodelia@gmail.com

Introducción. La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una de las enfermedades neoplásicas más importantes de los bovinos. Se presenta con mayor frecuencia en animales mayores a 2 años y más en rebaños lecheros que en los de carne (Trono, 2011).Tradicionalmente se estima que un 60 al 70% de los animales infectados sólo expresan anticuerpos; alrededor de un 30% de los infectados presentan linfocitosis persistente (LP) y un 2 al 10% pueden llegar a presentar linfosarcomas (Ferrer, 1979; Hamilton, 2003). Para considerar que un bovino tiene LP se requieren 2 muestras pareadas donde se repita el aumento de linfocitos.
Objetivo: estimar la proporción de bovinos infectados con LEB que desarrollan linfocitosis.
Materiales y métodos. Se seleccionaron 4 establecimientos de bovinos lecheros que contaban con antecedentes de LEB. Posteriormente se seleccionaron 143 animales a los que se les extrajo 3ml sangre sin anticoagulante, al mismo tiempo, se tomaron 3 ml de sangre con anticoagulante (una gota de EDTA). Las muestras de sangre extraídas se trasladaron refrigeradas hasta el Departamento de Patología Animal de la FAV-UNRC, donde se realizó su procesamiento. A todas las muestras se les realizó un leucograma. El conteo de leucocitos totales se realizó con un contador automático. Para el recuento diferencial se hizo un extendido a partir de una gota de sangre sobre un portaobjetos, se fijó con metanol y se coloreo con la tinción de Giemsa. La observación se realizó a través de un microscopio óptico en las siguientes etapas: en 10x se examinó la calidad global del frotis; en 40x se seleccionó la zona correcta del extendido donde realizar el recuento. Finalmente, con objetivo de 100x se clasificaron 100 leucocitos y se registraron como porcentajes de leucocitos (valores relativos). Para el diagnóstico serológico se utilizó el kit de ELISA LEUKOFAST con Se 97,2% y Es 97,5% (Trono, 2001). Se clasificaron los animales según los resultados de la serología en positivos y negativos. Según la leucometría se consideraron los animales con leucocitosis cuando el recuento superó los 15.000 leucocitos/μl y con linfocitosis los que presentaron un recuento linfocitario mayor a 10.000 linfocitos/μl (Denny, 2013). A su vez, los animales con linfocitosis se clasificaron en moderada, marcada o exagerada, para ello se extrapolo el parámetro usado para la clasificación de las leucocitosis (Denny, 2013).
Resultados. De un total de 143 bovinos adultos seleccionados, 120 (84%) fueron positivos a LEB por serología. Entre los infectados se encontró un 20% (n=24) con linfocitosis, mientras que de los negativos sólo el 5% (n: 1) tubo esa condición.
Algunos animales (n=3) presentaron linfocitosis, aunque tenían un conteo total de leucocitos dentro de los parámetros considerados normales. Otros (n=6) tenían aumento total de leucocitos debido a incremento de neutrófilos y con conteo normal de linfocitos.
En la gran mayoría de los animales (92%), la linfocitosis fue de moderada a marcada.
Discusión y conclusiones. Luego de que Ferrer en 1979 describiera que el 30 % de los infectados por LEB desarrollan linfocitosis persistente, se repite ese dato en la mayoría de los estudios sobre la enfermedad, aunque no encontramos trabajos más recientes que tengan por objetivo estimar la proporción de LP en animales infectados. Nuestro resultado se basa en una única muestra, por lo que es esperable que de haber repetido el leucograma para corroborar la persistencia de la linfocitosis, el porcentaje final sería menor a 20%, debido a que algunos animales pueden estar cursando una linfocitosis por causas ajenas a LEB. Creemos que es importante continuar aportando datos sobre el comportamiento actual de esta patología. Resaltamos la importancia de analizar el número de leucocitos y la distribución de poblaciones leucocitarias por separado, pues como era de esperar encontramos animales con leucocitosis debido a aumento en los neutrófilos y animales con linfocitosis sin leucocitosis. También acordamos con la necesidad de muestras pareadas para determinar la LP. Aunque, no podemos descartar que el animal negativo con linfocitosis exagerada pueda haber sido un falso negativo, las referencias bibliográficas y nuestros resultados muestran que es probable encontrar linfocitosis ajenas a la infección por LEB.

Bibliografía.

-Denny J. Meyer; John W. Harvey. 2013. El Laboratorio En Medicina Veterinaria. (INTER-MEDICA EDITORIAL, ed.).
-Ferrer, J.F. y col., 1979. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis: a review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 7, 705–708.
-Hamilton V., y col. Translocation of the B cell receptor to lipid rafts is inhibited in B cells from BLV-infected, persistent lymphocytosis cattle. Virology 315 (2003) 135–147.
-Trono K. y col. 2001. Veterinary Microbiology 83, 235-248
-Trono; K. 2011. Leucosis Bovina; una amenaza silenciosa. Producir XXI 19(233):44- 46.

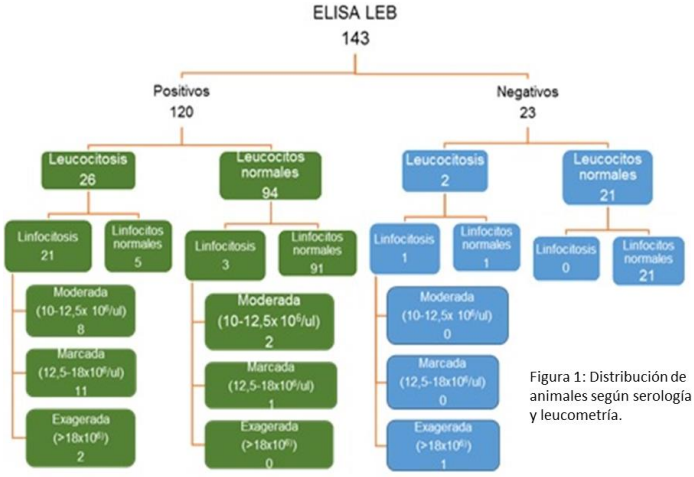


Figura 1: Distribución de animales según serología y leucometría.

V15- ESTANDARIZACION DE ENSAYOS DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMINATES (CAEV Y MVV) A PARTIR DE DISTINTOS TIPOS DE MUESTRAS

A. Raia [1], M. Olech.[2], C.J. Panei[3-4], N.A. Fuentealba[3-4], C. Rossanigo[5], J. Kuzmak[2], I.Alvarez.[1-4]
(1) Instituto de Virología, INTA. (2) National Veterinary Research Institute (NVRI) Polonia, (3) Laboratorio de Virología, FCV-UNLP, (4) CONICET, (5) Laboratorio de Sanidad Animal, EEA San Luis INTA.
alvarez.irene@inta.gob.ar

Introducción. El Virus Maedi-visna (MVV) y el Virus de la arteritis-encefalitis caprina (Caprine Arthritis-Encephalitis Virus- CAEV) son retrovirus estrechamente relacionados por lo que se los denomina Lentivirus de pequeños rumiantes (small ruminant lentiviruses – SRLVs). Afectan pequeños rumiantes como ovejas y cabras. Las infecciones se caracterizan por un comienzo insidioso y una progresión lenta. La mayoría de los animales infectados son asintomáticos, solo un porcentaje desarrollan un síndrome clínico caracterizados por una enfermedad inflamatoria multisistémica que afecta pulmones, sistema nervioso central, articulaciones y glándulas mamarias. Los animales infectados permanecen como portadores por el resto de su vida, y pueden transmitir la enfermedad a animales sanos. El diagnóstico de la infección es generalmente por pruebas serológicas, ya que la detección de anticuerpos es indicativo que el animal contrajo la enfermedad. Los ensayos de PCR son muy útiles como métodos complementarios a los serológicos, especialmente durante el período de ventana o ante la presencia de anticuerpos calostrales. Las PCR permiten además confirmar los hallazgos de cultivo celular y realizar estudios de información epidemiológica molecular.
Objetivo. Con el objetivo de disponer de una herramienta alternativa de diagnóstico, que resulte rápida y complementaria para la detección de CAEV/MVV en muestras de campo procedentes de casos naturales y de aislamientos en cultivo celular, se estandarizaron tres ensayos de PCR que amplifican distintas porciones del genoma de los SRLVs, que comprenden los genes *gag y env*.

Materiales y métodos. Para la estandarización de los ensayos de PCR se utilizaron muestras de cabras y de ovejas de sangre entera, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), homogenatos de tejidos y lisados de células de cultivo. Se extrajo DNA a partir de las diferentes muestras utilizando kit comercial. A partir del DNA extraído se detectó el provirus de CAEV/MVV mediante tres reacciones de PCR diferentes. Una reacción de PCR anidada del gen *gag* y dos PCR de las regiones variable del gen env de CAEV/MVV. Para la PCR-GAG se utilizaron los oligonucleótidos GAGF1/P15 para la primera ronda y CAGAG5/CAGAG3 para la segunda ronda (Olech y col, 2012; Valas y col 2007). Para la PCR-ENV-V1V2 se utilizaron los oligonucleótidos Ptat/Penv para la primera ronda y A51/B31 para la segunda ronda y para la PCR-ENV-V1V2 se utilizaron los oligonucleótidos Ptat/Penv para la primera ronda y 567F/564R para la segunda ronda (Germain y Valas, 2006; Olech y col., 2012). En los tres casos se ajustaron las condiciones del ciclado, y se estableció la temperatura de *annealing* de la reacción de PCR mediante un gradiente de temperatura y se fijó la concentración óptima de DNA en cada reacción. En todos los ensayos se utilizó DNA obtenido de un lisado de células infectadas con la cepa prototipo K1514 de MVV como control positivo.

Resultados. Fue posible detectar CAEV/MVV en muestras de sangre entera, homogenatos de tejidos y en lisados celulares de co-cultivos de células GSM con líquido sinovial, PBMC y homogenatos de tejidos mediante los tres ensayos de PCR de las distintas regiones genómicas de CAEV/MVV. De las 50 muestras analizadas solo 5 resultaron discordantes por al menos una de las reacciones de PCR.
La reacción de PCR fue específica para CAEV/MVV ya que ácidos nucleicos de diferentes patógenos de ovinos y caprinos resultaron negativos cuando fueron analizados con este ensayo de PCR.

Discusión y conclusiones. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pudo estandarizar tres ensayos de PCR para la detección de CAEV/MVV, con resultados confiables. Esto permite contar con una herramienta de diagnóstico rápida, complementaria a la serología, para la detección de animales infectados con CAEV/MVV. Del mismo modo, estos ensayos estandarizados permiten contar con una herramienta para la caracterización molecular de los SRLVs circulantes en nuestro país.

Bibliografía.

-Germain K, Valas S. Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. Virus Res. 2006 Sep;120(1-2):156-62. Epub 2006 Apr 17.
-OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. Artritis/encefalitis caprina y Maedi-Visna. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). 2008b. Capítulo 2.7.3/4.Olech, M., Rachid, A., Croisé B., Kuzmak J., Valas S. Genetic an antigenic characterization of small ruminant lentivisuses circulating in Poland. Virus Res. 2012 Feb;163(2):528-36. doi: 10.1016/j.virusres.2011.11.019
-Rossanigo C. E, Delgado G, Raia A, Delgado F, Carosio A, Alvarez I, Rey J., Rodriguez M. y Page W. (2016). Presentación clínica de un caso de Artritis-encefalitis caprina (CAE) y toxoplasmosis en San Luis (Argentina). Memorias XXI Reunión Científico Técnica de la AAVLD (Jujuy): Resumen V12
-Trezeguet M. A., Marcos Fabián Suárez, Leonardo, Enrique Barral, Florencia Periolo, Celia Esther Maidana, Patricio Carlos Farías, Carlos Eduardo Rodríguez, Rosa Teresa, Debenedetti, Andrea Marcos y Bernardo Cosentino. Informe del Senasa vol. 1, N.º 1, junio-agosto 2013
-Valas S, Benoit C, Guionaud C, Perrin G, Mamoun RZ. North American and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. Virology. 1997 Oct 27;237(2):307-18.

V16- DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RETROVIROSIS FELINAS POR PCR ANIDADA Y SU APLICACION EN LA TIPIFICACIÓN DE VIF

M. J Huguet[1] y A.C. Bratanich[1]
[1] Cátedra de Virología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.
huguet@fvet.uba.ar

Introducción

Las *retrovirosis* felinas comprenden dos enfermedades que afectan a los felinos domésticos, ocasionadas por dos virus pertenecientes a la familia *Retroviridae,* el Virus de la Inmunodeficiencia Felina (VIF), género *Lentivirus*, y el Virus de la Leucemia Felina (ViLeF), del genero *Gammaretrovirus*. Los virus pertenecientes a estos géneros poseen un genoma de ARN con polaridad positiva de aproximadamente 9,4 kb que codifica para tres genes: gag, pol y env. El genoma se retrotranscribe a ADN en el citoplasma de la célula infectada por medio de la enzima viral retrotrascriptasa para luego integrarse al genoma celular, lo que genera que los gatos permanezcan infectados de por vida. La sintomatología clínica que presenten variará según los subtipos virales. En el caso de VIF, las distintas cepas circulantes presentan diferencias en cuanto a la replicación y la patogenia, cursando con distintos grados de inmunodeficiencia, en gatos infectados con variante B o con sintomatología neurológica para la variante A. Los animales infectados se diagnostican por pruebas serológicas, las cuales tienen la ventaja de ser técnicas rápidas y relativamente económicas. Sin embargo, presentan el inconveniente de la baja sensibilidad que se relaciona con las particularidades de los ciclos replicativos de dichos virus y la variabilidad de las cepas circulantes. VIF presenta un ciclo replicativo largo con un periodo inicial en el cual los niveles de anticuerpos son bajos y pueden dar resultados falsos negativos. El diagnostico serológico de ViLeF presenta otro inconveniente, ya que hay animales que cursan con infecciones limitantes y no generan anticuerpos contra el virus, motivo por el cual las pruebas diagnósticas sanguíneas están orientadas a la detección de niveles en sangre de antígeno. Esta antigenemia puede ser baja o nula ya que el virus puede mantenerse en forma latente en la médula ósea de los gatos. Por la baja sensibilidad que tiene el diagnóstico serológico, en la Cátedra de Virología de Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA se desarrolló un diagnóstico molecular por PCR para la detección de las retrovirosis felinas.

Materiales y métodos

En el caso del diagnóstico de VIF se analizaron secuencias reportadas en la bibliografía para determinar la mejor región a amplificar y se seleccionaron primers que amplifican el gen gag, que codifica para la proteína p24. Para aumentar la sensibilidad y la especificidad de la técnica, se desarrolló una PCR-Anidada o nested-PCR, que consiste en una primera reacción de PCR seguida de una 2da, utilizando primers complementarios a regiones internas del primer producto de amplificación. De esta manera en la primera ronda se amplifica una región comprendida entre las posiciones 1026 y 1700 del genoma viral y en la segunda, una región mas pequeña, entre las posiciones 1026 y 1365, utilizando como molde el producto del primera ronda. En la puesta a punto se modificó la secuencia de los primers de la segunda ronda con el fin de poder amplificar las variantes de mayor circulación. Se identificaron 6 subtipos circulantes a nivel mundial: A, B, C, D, E y F. En Argentina, se detectó la circulación de los subtipos B, E y en 2017, nuestro servicio diagnóstico reportó las primeras cepas del subtipo A.

El diagnóstico de ViLeF se realiza por una PCR anidada que amplifica una región conservada del genoma viral ubicada en los extremos llamada LTR (Long Terminal Repeat). En la primera ronda se amplifican 234 pb, de la posición 18 a la 252, y en la segunda, un fragmento de 165 pb, de la posición 67 a la 232. Para amplificar esta zona se utilizan primers específicos de ViLeF, ya que existe en el genoma felino retrovirus endógenos, que podrían generar resultados falsos positivos.

A partir de 0,5 ml de sangre entera con EDTA o punción de médula ósea se extrae el ADN de los linfocitos donde el provirus se encuentra integrado, utilizando un kit de extracción (Easy Pure Blood Genomic Extraccion kit, Transagen). Para la reacción de PCR anidada, tanto de VIF como ViLeF se utilizan 2 ul del ADN extraído como molde en la primera ronda y 1ul del producto de la primera amplificación como molde de la segunda ronda. La reacción de PCR puede ser inhibida por distintas sustancias, como por ejemplo la hemoglobina presente en la muestra de sangre, por lo tanto, para poder determinar si la calidad del ADN es suficiente para la PCR, se realiza la amplificación de un gen felino como control interno de calidad. Se utiliza el gen Mdr-1 que codifica para un receptor de membrana, porque tiene las mismas condiciones de reacción que el diagnóstico para VIF.

Resultados

Durante el año 2017 en el Servicio de Retrovirosis de la cátedra de Virología, se realizó el diagnóstico molecular de 188 muestras para VIF/ViLeF, detectándose 53 muestras positivas para VIF (28,2%) y 42 positivas para ViLeF (22,3%), porcentajes coincidentes con los reportados en otros países. Por otro lado, hemos informado las primeras cepas circulantes en la Ciudad de Buenos Aires del subtipo A, siendo éste el único reporte en Argentina hasta el momento.

Conclusiones

Un aspecto importante del diagnóstico molecular de las retrovirosis felinas es la detección de animales clínicamente sanos que estén infectados, principalmente en los gatos infectados por el Virus de la Leucemia Felina que cursen infecciones limitantes, que dan negativos al diagnóstico por serología. Estos animales podrían ser fuente de transmisión del virus en caso de ser utilizaos como dadores de sangre ya que el virus hace latencia en médula ósea.

Bibligrafia

Cammarota, G., Da Prato, L., Nicoletti, E., Matteucci, D., Bendinelli, M. & Pistello, M. (1996). Quantitation of feline immunodeficiency proviruses in doubly infected cats using competitive PCR and a fluorescence-based RFLP. J Virol Methods 62, 21–31.

Galdo Novo, S., Bucafusco, D., Diaz, LM., Bratanich, AC. (2016). Viral diagnostic criteria for Feline Immunodeficiency virus and Feline Leukemia virus infections in domestics cats from Buenos Aires, Argentina. Rev Arg de Microb.48 (4), 293-297.

V17- DISEÑO DE PCR PARA DIFERENCIAR CEPAS SALVAJES DE VACUNALES DE PARVOVIRUS CANINO

C. Guaragna[1], A.C. Bratanich[1] y D. Bucafusco[1]
[1] Cátedra de Virología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.
carinaguar@gmail.com

Introducción

El Parvovirus Canino tipo 2 (CPV-2) es el agente responsable de una severa gastroenteritis hemorrágica con alta tasa de mortalidad en perros jóvenes. Es una enfermedad emergente que apareció por primera vez en Estados Unidos en 1978, diseminándose rápidamente a nivel mundial. Un par de años después de su aparición, el CPV-2 evolucionó a nuevas variantes antigénicas, distinguiéndose en la actualidad la co-circulación de tres genotipos: CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c . Estas nuevas variantes han desplazado al CPV-2 original, el cual es utilizado hoy en día preferentemente para la fabricación de vacunas a virus vivo atenuado. El Parvovirus canino, es un virus DNA de hebra simple, sin envoltura, con una cápside icosaédrica y un genoma de aproximadamente 5000 pb que codifica para proteínas no estructurales y estructurales. Entre las proteínas estructurales, la proteína de la cápside VP2 es objeto principal de estudio, por ser la región de mayor reconocimiento antigénico y de variación antigénica del virus. En efecto, los 3 genotipos circulantes se diferencian únicamente en un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) presentes en la secuencia del gen que codifica para la proteína VP2 (*1*). Como en la mayoría de las infecciones virales, la principal medida profiláctica para la enfermedad es la vacunación. La vacunación a temprana edad puede proveer sólida inmunidad pero también puede generar una depleción de los anticuerpos calostrales del cachorro generando un periodo de mayor susceptibilidad (*2*, 3). Trabajos recientes han demostrado que es posible la excreción de virus vacunales en heces de animales vacunados durante cierto período de tiempo (*4*). La alta incidencia de la enfermedad luego de la primera vacunación puede ser consecuencia de la depleción de los anticuerpos y/o la demora en la generación de una respuesta inmune activa. En estas situaciones se genera el interrogante acerca del origen del virus detectado durante cuadros gastroentéricos, por lo tanto, la detección de CPV en materia fecal no es suficiente para implicarlo como agente causal de enfermedad.

En la actualidad, existen diversos métodos diagnósticos utilizados para identificar CPV-2, tales como el aislamiento viral, la hemoaglutinación, determinación de antígenos por pruebas rápidas y PCR (5). No obstante, no existe una herramienta diagnóstica que permita distinguir cepas vacunales de las cepas de campo. Los mayores impedimentos para el desarrollo de un diagnóstico diferencial es la escasa diferencia antigénica y ausencia de información genética acerca de los virus incluidos en las vacunas.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una estrategia de diagnóstico molecular por PCR que permita diferenciar las cepas vacunales de las cepas salvajes de Parvovirus canino.

Materiales y métodos

Para cumplir con el objetivo propuesto, primeramente se realizó un relevamiento de las vacunas para Parvovirus canino que se comercializan en Argentina. Se procedió a la extracción del ADN de las diferentes vacunas para amplificar por PCR el fragmento correspondiente al gen que codifica para la proteína VP2 completa. Luego de secuenciados, los diferentes productos de PCR fueron alineados con secuencias correspondientes a la proteína VP2 de las distintas cepas salvajes de Parvovirus canino CPV-2, CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c publicadas en el Genbank, utilizando programa Clustal W en Bioedit. Se lograron identificar 3 mutaciones presentes solo en las cepas vacunales analizadas que permitieron el diseño de una PCR para diferenciar las cepas vacunales de las salvajes. Para esto, se diseñaron 3 primers específicos (81 forward, 252 forward y 840 reverse) y se estandarizaron las condiciones de PCR utilizando distintas combinaciones de los mismos en diferentes temperaturas de annealing.

Aquella PCR que demostró la mejor performance fue validada mediante la utilización de 50 muestras de campo con diagnóstico positivo por PCR para Parvovirus canino y 7 cepas vacunales.

Resultados

La combinación de primers FW 252-Rev 840 utilizando una temperatura de anealing de 55ºC y 35 ciclos de amplificación, fue la que mostró una mejor performance, amplificando el fragmento correspondiente en todas las vacunas y siendo negativa en las 50 muestras de campo, que sí fueron positivas con los primers que se utilizan rutinariamente para el diagnóstico de Parvovirus canino por PCR.

Conclusiones

El desarrollo de esta técnica diagnóstica permitiría diferenciar las cepas vacunales de las salvajes, aportando información de utilidad para el manejo epidemiológico de los caninos que presenten signos compatibles con infecciones de parvovirus.

Bibliografía

- M. G. Calderon *et al.*, Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *J. Virol. Methods*. **159**, 141–5 (2009).
- D. J. Moore, Canine parvovirus immunoprophylaxis: a review. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **54**, 259–64 (1983).
3. T. Waner, A. Naveh, I. Wudovsky, L. E. Carmichael, Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* **8**, 427–32 (1996).
- N. Decaro *et al.*, Long-term viremia and fecal shedding in pups after modified-live canine parvovirus vaccination. *Vaccine*. **32**, 3850–3 (2014)
- N. Decaro, C. Buonavoglia, Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* **155**, 1–12 (2012).
.

V18- PRIMER CASO DE FIEBRE CATARRAL MALIGNA EN BOVINOS DE LA PATAGONIA ARGENTINA

A. Martinez[1*]; A. Correa[2]; A. Bratanich[3]; R. Apóstolo[4]; R. Marcellino[1]; C. Robles[1]
[1]Grupo de Salud Animal INTA Bariloche; [2] Actividad Privada.; [3] Laboratorio de Virología FCV-UBA; [4]Grupo de Producción Animal INTA Esquel.
*Email: martinez.agustin@inta.gob.ar

Introducción. En la Patagonia argentina las enfermedades bovinas con sintomatología nerviosa frecuentemente no llegan a confirmarse mediante un diagnóstico etiológico de certeza. Esto se refleja con los escasos reportes de tétanos y leucinosis o enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce en terneros, intoxicación por *Astragalus pehuenches* y *Condalia microphylla*, casos anecdóticos de intoxicación por *Festuca argentina y* una enfermedad con diagnóstico indefinido que está siendo actualmente estudiada. Recientemente en el noroeste de Chubut se aisló por primera vez el virus Herpes Bovino tipo 1(BoHV1), pero fue a partir de muestras de bovinos con conjuntivitis clínica[1]. Teniendo en cuenta que la actividad productiva bovina se ha incrementado en determinados áreas de valles patagónicos y en la cordillera y a la posibilidad de apertura hacia mercados extranjeros al ser libre de Fiebre Aftosa, es fundamental mantener activa la vigilancia epidemiológica en la región con el fin de diagnosticar y caracterizar la presentación de enfermedades bovinas en general y con sintomatología nerviosa en particular. En este sentido, ante la ocurrencia de muertes en bovinos en la provincia de Chubut, se realizó una tarea diagnóstica para tratar de arribar a la causa de la mortandad.

Materiales y métodos. El brote ocurrió en noviembre de 2017 en un feedlot con 450 bovinos ubicado en cercanías de la localidad de Cholila, al noroeste de Chubut. Al momento de la intervención diagnóstica, ya habían muerto súbitamente tres animales. Un cuarto animal manifestaba pérdida progresiva de la condición corporal con marcada sintomatología nerviosa. Luego de la revisación clínica, el animal fue sacrificado y necropsiado tomándose muestras de hígado, riñón, bazo, pulmón, ojo, médula espinal y una mitad del encéfalo que fueron fijadas en formaldehído al 10% bufferado, incluidas en parafina y procesadas para su estudio histopatológico. Además se obtuvieron muestras de LCR y SNC para cultivo microbiológico. Se remitieron al Laboratorio de Virología de la Universidad de Buenos Aires muestras de SNC y bazo para PCR para detectar la presencia de ADN de virus Herpes Ovino-2 (OvHV-2). Finalmente, se tomaron muestras de SNC y buffy coat de sangre entera para aislamiento virológico y PCR para BoHV 1 y 5, mientras que muestras pareadas de suero de animales del lote se analizaron por ELISA para detectar la presencia de anticuerpos contra BoVH1.

Resultados. Los principales signos clínicos observados fueron temperatura rectal de 41,6ºC, marcha en círculo, opacidad corneal bilateral y sialorrea. A la necropsia no se hallaron lesiones macroscópicas evidentes. Del líquido cefalorraquídeo y del SNC se aislaron escasas colonias de *Enterococcus sp* y *Streptococcus sp*. En el estudio histopatológico de varias regiones del SNC (corteza cerebral, tálamo, puente, cerebelo y óbex) se observó vasculitis con moderada a severa infiltración de células inflamatorias mononucleares principalmente linfocitos, células plasmáticas y escasos macrófagos. En corteza frontal y occipital se observó leve edema perineuronal en capas corticales y hemorragias localizadas. En hígado, riñón y bazo se observó vasculitis necrotizante con presencia de células mononucleares. Tanto las muestras del SNC como de bazo resultaron positivas a OvHV-2. Las muestras del SNC y buffy coat analizadas por aislamiento virológico y PCR resultaron negativas a BoHV 1 y 5. No se detectó seroconversión para BoHV1 en los animales del lote.

Discusión. Los hallazgos epidemiológicos, clínicos histopatológicos y moleculares confirman que el animal con sintomatología nerviosa presentaba una infección por OvHV2, uno de los agente etiológicos de la Fiebre Catarral Maligna (FCM). La FCM es una enfermedad que afecta a bovinos, bubalinos, cérvidos y porcinos presentándose generalmente, con una baja morbilidad pero alta letalidad. La especie reservorio del virus OvHV-2 son los ovinos, quienes en la mayoría de los casos no manifiestan la enfermedad clínicamente[3]. Hasta la fecha, no existen evidencias de contagio horizontal entre bovinos enfermos y sanos, con lo cual el aislamiento y/o cuarentena de animales afectados no tendría efecto alguno para disminuir el contagio y dispersión de esta enfermedad[5]. Debido a que aún no se dispone de vacunas, el único método de control sugerido es evitar el pastoreo mixto y con estrecho contacto entre bovinos y determinadas categorías de ovinos, como borregos entrando a la pubertad y madres en el periodo del parto, ya que estas son las categorías con mayor capacidad para liberar partículas víricas[3].

Si bien se cuenta con el diagnóstico confirmado de un sólo animal, los hallazgos de necropsia reportados por el veterinario en dos animales muertos previamente y las lesiones histopatológicas halladas en los pulmones de esos animales (datos no mostrados), sugieren que la causa de muerte podría haber sido la misma. De este modo se consideró una morbilidad del 0,7% y una letalidad del 100% para el presente brote, coincidiendo con las tasas para esta enfermedad descriptas en otras regiones del país y el mundo [2,5].

Desde hace años se sospecha que esta enfermedad produce mortandad de bovinos en Argentina [2], sin embargo este caso y otro contemporáneamente diagnosticado en un rodeo de la provincia de Buenos Aires (Canton G, comunicación personal), son los primeros casos que confirman la presencia del agente viral asociados a bovinos enfermos clínicamente o muertos.

Debido a que no es posible el cultivo del virus, las únicas técnicas diagnósticas capaces de confirmar casos de esta enfermedad son la técnica de PCR[4] y la hibridación *in situ* la cual aún no está disponible en el país. Sin embargo, una correcta anamnesis, revisación clínica y estudio histopatológico continúan siendo técnicas fundamentales que permiten realizar un diagnóstico presuntivo con elevada certeza para luego confirmarse con los análisis específicos realizados en laboratorio especializados.

Agradecimientos: A la Med. Vet. Abril Centurión quien atendió los primeros casos en el establecimiento. Financiado parcialmente por el SIRSA (Sistema Regional de Salud Animal) del INTA Bariloche y por la actividad del PNSA PE 1115054 “Diagnóstico monitoreo y vigilancia de enfermedades complejas y emergentes” realizadas en la Patagonia.

Bibliografia

1-Apostolo R, et al. Primer aislamiento de BoHV1 en bovinos de Patagonia, Argentina. Rev. *Med Vet Arg* 2017. 90(2):16-20.

2-Miranda, A; et al. Presunto caso de fiebre catarral maligna en la provincia de La Pampa, Argentina. 2015. *Vet. Arg. XXXII: 331.*

3-Li H, et al. Shedding of ovine herpesvirus 2 in sheep nasal secretions: the predominant mode for transmission. *J Clin Microbiol* 2004. 42: 5558-5564.

4-Collins JK, et al. Malignant catarrhal fever: polymerase chain reaction survey for ovine herpervirus 2 and other persistent herpesvirus and retrovirus infections of dairy cattle and bison. *J Vet Diagn Invest* 2006, 18:119-123.

5-Moore DA, et al. Outbreak of malignant catarrhal fever among cattle associated with a state livestock exhibition. *JAVMA* 2010.237:87-92.

V19- DETECCION DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA Y DE MICOPLASMA EN MUESTRAS DE SUERO FETAL BOVINO IRRADIADO

J. Perez López [(1)], R. Politzki[(1)], L. Franco[(2)], A. Pecora [(1-2)], V. Ruiz [(1-2)], I. Alvarez I[(1-2)]
(1) Instituto de Virología INTA, (2) CONICET
alvarez.irene@inta.gob.ar

Introducción

El suero fetal bovino (SFB) es el suplemento más comúnmente utilizado en medios de cultivo de células animales. Los cultivos celulares tienen muchas aplicaciones clínicas en medicina, como la producción de vacunas, pruebas de diagnóstico y terapia celular. El SFB es utilizado en cultivos celulares ya que contiene muchos más factores de crecimiento respecto de otras fuentes de suero animal y tiene la ventaja tener niveles muy bajos de anticuerpos. El virus de la Diarrea virla bovina (BVDV) es un contaminante común de materiales biológicos como el SFB, ya que el virus puede pasar verticalmente de vaca a feto, causando aborto, nacimiento de terneros malformados y terneros nacidos con infecciones persistentes y de por vida. Otro contaminante común con las especies pertenecientes a los géneros *Mycoplasma y Acholeplasma* (a los que se hace referencia colectivamente como micoplasmas). Cultivos celulares contaminados con micoplasmas pueden producir alteraciones en las células de cultivo, alterando la producción de biológicos. Una forma de reducir el riesgo durante el proceso de fabricación de un producto biológico derivado de cultivo de células es aplicar un tratamiento sobre los materiales derivados de animales, como el SFB, para inactivar posibles contaminantes. La irradiación gamma es uno de los métodos más ampliamente empleados para la inactivación de virus y de micoplasmas en sueros de animales. Normalmente se realiza a una dosis de radiación total de 25e40 kGy, y tiene la ventaja de que el tratamiento puede aplicarse al material en el envase original sin descongelar el suero.

Objetivo. Determinación del riesgo de introducción de un contaminante accidental de material genético de BVDV y de Micoplasma en muestras de SBF de origen argentino tanto en la muestra de SFB irradiado original como en la muestra luego de tres pasajes ciegos en células MDBK.

Materiales y métodos

Se analizaron 60 lotes de SFB irradiado procedentes de diferentes proveedores de SFB de la Argentina. Cada lote de SFB original fue evaluado en forma original (SFB-PURO) y luego de ser inoculado y pasado en forma ciega (tres veces) en células MDBK (SFB-MDBK). Ambas muestras fueron analizadas por la prueba de RT-PCR para la detección de un fragmento complementario a la región genómica 5´UTR de BVDV según Vilcek 1984, y por la prueba de PCR para detectar la presencia de material genético de Micoplasma amplificando un fragmento de 270 pb complementario a la región 16S rRNA según Kupperveld y col. 1993.

Para la RT-PCR de BVDV se realizó la extracción de RNA total utilizando el kit comercial *High Pure RNA Isolation Kit* (ROCHE), se realizó la reacción de transcripción reversa utilizando como templado el RNA obtenido y los reactivos MMLV-RT (Promega) y *random hexámeros, y* luego la reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos 5´UTRF y 5´UTRR. Como control positivo se utilizó virus BVDV citopático cepa Singer. La presencia del producto amplificado fue revelada por electroforesis en gel de agarosa 2% y comparada frente a un patrón de peso molecular. Para la PCR de Micoplasma se realizó la extracción de DNA total con el kit de extracción *High Pure DNA Isolation KIT* (ROCHE), y luego la reacción de PCR con los oligonucleótidos GPO3 y MGSO específicos para microorganismos de los géneros Micoplasma y Acholeplasma. Se analizaron paralelamente controles positivos y negativos. La presencia del producto amplificado fue revelada por corrida electroforética en un gel de agarosa 2% y comparada frente a un patrón de peso molecular.

Resultados

Cuando se analizaron las 60 muestras de SFB-PURO, se detectó material genético de BVDV en 20 (33%) y material genético de Micoplasma en 14 (23%). Solo 4 muestras (7%) resultaron positivas tanto a BVDV como a Micoplasma, mientras que 30 (50%) resultaron negativas a ambos materiales genéticos. Todas las muestras resultaron negativas a la detección de BVDV y Micoplasma luego de los tres pasajes ciegos en células MDBK.

Discusión y conclusiones

La detección de material genético de BVDV y Micoplasma indica que el material de origen estuvo contaminado con dichos agentes, pero no implica infectividad del material. Dado que en algunas de las muestras de SFB-Puro se detectó material genético de los agentes en estudio y luego de los pasajes en células no fue posible detectarlos, se estaría demostrando la capacidad inactivante de virus y Micoplasma que posee la irradiación. Los resultados obtenidos refuerzan la importancia de utilizar SFB irradiado como suplemento en los ensayos en cultivo de células en la elaboración de productos biológicos, de forma de minimizar el riesgo de introducción de un contaminante accidental en células, y por ende en el producto final.

Bibliografia

-Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Arch Virol. 1994;136(3-4):309-23.

-OIE - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestral Animals, edición 2008. Chapter 2.4.8

-van Kuppeveld FJ, Johansson KE, Galama JM, Kissing J, Bölske G, van der Logt JT, Melchers WJ. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. Appl Environ Microbiol. 1994 Jan;60(1):149-52

V20- DIAGNOSTICO DE INMUNODEFICIENCIA FELINA Y LEUCEMIA FELINA MEDIANTE LA TECNICA DUPLEX PCR

MA. Tizzano[1], GH. Sguazza[1], CG. Aspitia[1], NA. Fuentealba[1,2], CM. Galosi[1,3], MR. Pecoraro[1]
1-Cátedra Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, Calle 60 y 118 s/n, La Plata, CP1900, Bs As, Argentina. 2-Conicet. 3- CIC. mtizzano@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

El virus de la inmunodeficiencia felina (FiV) es un Lentivirus complejo que comparte muchas de sus características genómicas, estructurales y bioquímicas con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). La enfermedad, conocida como síndrome de inmunodeficiencia felina se caracteriza por fiebre, linfoadenopatías, leucopenia, anemia, anorexia y caquexia, agravada por infecciones secundarias y desórdenes neurológicos. La transmisión de esta enfermedad se produce principalmente por mordeduras pero también puede darse por la vía sexual, intrauterina pre e intra partum así como también a través de la leche materna. La infección es más común en gatos mestizos, vagabundos o con libre acceso al exterior. [1,2]. Las infecciones por éste virus pueden ser únicas o en asociación con otros virus que afectan a felinos. Una de las coinfecciones más comunes se da con el virus de la leucemia felina, presentándose en estos casos, cuadros clínicos de mayor severidad. [3]

El virus de la leucemia felina (FeLV) es un gammaretrovirus que se encuentra asociado a anemia, inmunodeficiencia, leucemia, and linfoma en gatos [4]. FeLV se encuentra distribuido alrededor del mundo y su prevalencia varía de acuerdo con la ubicación geográfica y los factores de riesgo que incluyen edad, estado sanitario y densidad poblacional. [4, 5]

Los métodos más utilizados para el diagnóstico de FiV y FeLV son la Inmunofluorescencia indirecta, ELISA y la Inmunocromatografía. Las dos primeras técnicas se basan en la detección de anticuerpos específicos contra proteínas virales. [5]La primera tienecomo desventaja que de requiere el mantenimiento de una línea celular persistentemente infectada que exprese antígenos virales. Mientras que los kits comerciales son importados y muy costosos, haciéndolos poco accesibles a las personas que poseen gatos como mascotas. Además existen portadores asintomáticos en ambas virosis que contribuyen a la diseminación de la enfermedad, los cuales pueden no presentar niveles de anticuerpos detectables por estas técnicas.

El objetivo de éste trabajo fueel desarrollo de una técnica de Duplex PCR como alternativa para el diagnóstico de FiV y FeLV.

Materiales y métodos

Se realizaron análisis de secuencias genómicas para el virus FiV y el FeLV con el fin de desarrollar *Primers* específicos para amplificar selectivamente un fragmento del gen pol y el gen gag respectivamente(tabla 1).Posteriormente se procedió a realizar ensayos de PCR con el fin de optimizar dichas reacciones, en forma individual y luego en combinación. Para ello se realizó un extracción de ADN a partir de sangre con anticoagulante (citrato sódico) proveniente de un felino coinfectado con FIV y FeLV, utilizando un kit de extracción de ADN comercial. Las reacciones se llevaron a cabo a partir de 100 ng de ADN extraído, 0.4μM de cada cebador y con un volumen final de 25 µl. El ciclado utilizado fue:una desnaturalización inicial (95º, 4 min) seguida de 35 ciclos de(94º, 1 min; 52º, 1; 72º, 1 min) y una extensión final de 72º, 5 min.

Tabla 1

Primer FeLV Foward	5´GACTTAACTGACCAGCCGTT 3´
Primer FeLV Reverse	5´TGGGTAAGAATAACGCCTCTA 3´
Primer FiV Foward	5´TGGATGGGTTATGAATTACATCC 3´
Primer FiV Reverse	5´CCATCTATATACCATGTTTCTGC 3´

Resultados

Los resultados se evidenciaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio. Para FiV pudo observarse en el gel la presencia de una banda de 636 pares de bases, mientras que para FeLV el tamaño de la banda observada fue de 360 pares de bases. Estos tamaños resultaron concordantes con los estimados inicialmente. A continuación se evaluaron 20 muestras clínicas provenientes de animales con y sin signología clínica compatible con las enfermedades descriptas anteriormente. De las muestras analizadas, en 4 se observó coinfección con ambos virus, en 10 solo con FeLV, en 3 solo con FiV y tres muestras en las cuales no se detectaron ninguno de los virus.

Conclusión

La técnica desarrollada permitirá su utilización en el diagnóstico de FiV y FeLV de manera rápida, simultáneamente, brindando una alternativa más económica que permita el control de estas virosis.

Bibliografia

-Leavell S, Wrigh B, Scarpino L, Sirriyah J, Chen C, Clement J D, Burkhard M J. Inducción of serum and mucosal FIV-Specific immune response by intranasal inmunization with p24Gag.Vaccine. 2005 23: 1471-14782-Barr M C, D M V. Feline immunodeficiency Virus Test and their Interpretetion. Feline HeathTopis. 1993(8):3

-Furuya T, Hasegawa A, Saitoh M, Miyazawa T, Tohya Y, Hayami M, Takahashi E, Miki K, Mikami T. Expression of feline immunodeficiency virus gag gene in Escherichia Coli. Arch virol 1992 (122): 383-390.

-Faruku Bande, SitiSuriArshad, Latiffah Hassan, and ZunitaSakaria. Molecular detection, Phylogenetic Analysis, and Identification of Transcription Motifs in Feline Leukemia Virus from NaturallyInfected Cats in Malaysia.Veterinary Medicine International.2014. http://dx.doi.org/10.1155/2014/760961.

-Gomes-Keller M. A, Gonczi E, Tandon R, Riondato F, Hofmann-Lehmann R, Meli M. L, and Lutz H. Detection of Feline Leukemia Virus RNA in Saliva from Naturally Infected Cats and Correlation of PCR Results with Those of Current Diagnostic Methods. J. OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 2006 (44): 3. 916–922.

V21- LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN TAMBOS DE AGRICULTURA FAMILIAR

M. Patrucco[3,4], M. Vazzano[1], MJ. Paredes [1,3], F. Álvarez [3], G. Cotter[3,5], L.Butler[3,6], I.Carricart[7], M.Valero[8], M.Melia[3], CJ.Panei, [1,2,3,], G.Principi[3], A. Valera[1,3], A. Larsen[1,3]

[1]LAVIR (FCV-UNLP), [2]Investigador Asistente CONICET, [3]Proyecto Tambos y Cerdos Sanos FCV-UNLP, [4]Becario UNLP. [5] SENASA. [6] INTA, [7] Técnico, [8]Subsecretaria de Agricultura Familiar.

Introducción

El virus de la leucosis bovina (VLB) es un retrovirus reconocido como el agente etiológico de la leucosis enzoótica bovina (LEB). Esta enfermedad es de distribución mundial y está presente en Argentina, generando pérdidas productivas y económicas en establecimientos de producción bovina. Estudios anteriores mostraron mayor impacto en establecimientos de producción lechera con prevalencia de 38,25% total evaluado con un test de enzimo-inmunoensayo (INTA-ELISA test) en la provincia de Buenos Aires respecto de establecimientos cárnicos evaluados en la Cuenca Deprimida del Salado con prevalencia de 6,6% con inmunodifusión en agar gel (IDGA). La enfermedad es de curso crónico y posee un largo periodo de incubación. Puede estar afectado un elevado porcentaje de los bovinos de un establecimiento sin embargo suele presentarse en forma asintomática con linfocitosis persistente (20-30%). Sin embargo un bajo número de animales, generalmente mayores de tres años, pueden desarrollar síntomas clínicos de la enfermedad como neoplasias, linfosarcoma (1-5%). El resto de los bovinos infectados que no desarrollan la enfermedad clínica constituyen la principal fuente de contagio de la infección debido a que el virus se integra como provirus en los linfocitos B trasformando al animal en portador de por vida. En nuestro país, el SENASA (Res 337/94) reglamentó el sistema de certificación de establecimientos libres de leucosis, al cual los productores pueden adherir voluntariamente. Aquellos tambos que estuvieran infectados se estratifican de acuerdo a la prevalencia, en tambos de Clase A con 1% a 15% de animales infectados; tambos de clase B con 16% a 30% de animales infectados; y tambos de Clase C con más del 30% de animales infectados

El diagnóstico del estado sanitario en las unidades productivas es clave para la aplicación de programas sanitarios adecuados a los diferentes sectores de la actividad ganadera. El presente trabajo se realizó enmarcado en el proyecto de extensión Tambo y Cerdos Sanos (TyCS) de la facultad de Cs Veterinarias de la UNLP (FCV-UNLP) en relación a la agricultura familiar, y para este trabajo en articulación con el SENASA y la subsecretaria de Agricultura Familiar, en actividad conjunta y coordinada para lograr la regularización e inserción en los programas de control y erradicación de tuberculosis y brucelosis. El proyecto capitaliza el trabajo de extensión articulando con docencia e investigación como parte del fortalecimiento del vínculo universidad-sociedad formando estudiantes desde la intervención en territorio, toma de muestras y trabajo de laboratorio diagnóstico logrando la adquisición de competencias basada en la construcción de saberes prácticos profesionales y no académicos contextualizados. El proyecto promueve la producción pecuaria en establecimientos de la agricultura familiar, llevando adelante tareas de desarrollo rural atendiendo la salud animal y la calidad sanitaria de sus productos y su impacto en la salud pública en un sector que se preocupa por salir de la informalidad para colocar sus productos en circuitos de la economía formal. La actividad principal de dichos establecimientos es el tambo cuyos productos son masa para mozzarella y quesos artesanales, para autoconsumo y venta. El objetivo de este trabajo fue el relevamiento serológico de la leucosis enzoótica bovina en establecimientos de la agricultura familiar.

Materiales y métodos

Todas las tareas fueron realizadas por los participantes estudiantes del proyecto TyCS. Se muestrearon bovinos de leche pertenecientes a establecimientos tamberos de los partidos de Punta Indio y Magdalena. Las muestras de sangre se acondicionaron en el laboratorio de virología (LAVIR) de la FCV-UNLP, para su posterior procesamiento. En el marco de un taller teórico-practico organizado por el proyecto de extensión, se procesaron 637 muestras provenientes de rebaños bovinos heterogéneos distribuidos en 16 establecimientos. Para la determinación de anticuerpos específicos contra VLB se realizó la técnica de IDGA (inmunodifusión en gel de agar) según las especificaciones descriptas en el manual de la OIE. Se utilizó el equipo comercial producido en LAVIR, aprobado por SENASA. La prevalencia fue analizada con un 95% de confianza, teniendo en cuenta las características operativas de la prueba (80% sensibilidad y 99% especificidad) (http://www.winepi.net/sp/disease/cprev3.asp).

Resultados

Los resultados obtenidos de la lectura de las placas de IDGA indican que se encontraron animales positivos en la totalidad de los establecimientos muestreados. Del total de los 637 animales muestreados pertenecientes a los 16 establecimientos se obtuvieron 284 muestras positivas a VLB. Estos resultados determinan una prevalencia total del 55.17%. Si se realiza un análisis de la prevalecía para cada establecimiento, estas son en algunos casos considerablemente más altas llegando incluso hasta el 88.40%.

Discusión y conclusión

En este relevamiento ningún establecimiento resulto negativo y se clasificaron en Clase B al 37.5% de los establecimientos y el 62.5% en Clase C. Los valores de seroprevalencia determinados dificultan diagramar un plan de saneamiento que no conlleve a grandes pérdidas económicas imposibles de afrontar por el sector. Los establecimientos tipo C presentan una situación interesante para implementar un plan de saneamiento progresivo basado en el estudio de la carga viral por la prueba de ELISAp24r, y plantear la eliminación de animales de alta carga viral, y proponer un manejo productivo y diferencial entre animales negativos y de baja carga viral.

Bibliografía

-Panei CJ, Tassara F, Pérez Aguirreburualde MS, Echeverría MG, Galosi CM, Torres A, Silva HJE. 2017. Seroprevalencia de infección por el virus de leucosis bovina durante 2015 en rodeos de cría de la Zona Deprimida del Río Salado, provincia de Buenos Aires, Argentina. Analecta Veterinaria. 37(1): 65-68.

-Trona KG, Perez-Filguieira DM, Duffy F, Borca MV, Carrillo C. 2001. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison sensitivity and specificity of different detection methods. Veterinary Microbiology 83. 235-248.

-De la Sota MD. 2005. Manual de procedimientos de leucosis
enzoótica bovina. Dirección Nacional de Sanidad Animal. Buenos Aires. Disponible en: www.intranet.senasa.gov.ar

-OIE 2008. Manual terrestre Cap. 2.4.10 Leucosis enzootica bovina. url: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.10_Leucosis_bovina_enzo%C3%B3tica.pdf

V22- APLICACIÓN DE LA TECNICA DE AMPLIFICACION ISOTERMICA MEDIANTE HORQUILLAS (LAMP) PARA EL DIAGNOSTICO DE PARVOVIRUS CANINO

S. Galdo Novo[1], D. Bucafusco[1], L. Diaz[1]., AC. Bratanich[1].
[1]. Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280, CP 1417, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
sgaldonovo@fvet.uba.ar

Introducción

La amplificación de ácidos nucleicos (AN) es un proceso ampliamente utilizado en variados campos, entre ellos el de diagnóstico de enfermedades infecciosas. El primer método utilizado para ello, fue la PCR, implicando la necesidad de contar con equipamiento de laboratorio. El LAMP (del inglés *Loop mediated isothermal amplification*) es un método de amplificación isotérmica diseñado para detectar AN sin requerir equipo sofisticado (Notomi y cols., 2010). Otras de las ventajas del LAMP son su alta sensibilidad (para fg o <10 copias del objetivo), resultados rápidos (las reacciones se pueden realizar en tan solo 5-10 minutos) y la posibilidad de observar el resultado a simple vista (Zanoli y cols., 2013). Como objetivo de este trabajo se aplicó la técnica de LAMP desarrollada por Mukhopadhyay y cols., 2012, para determinar la presencia del parvovirus canino en materia fecal de 41 muestras obtenidas de caninos con sintomatología compatible. El fin de esta aplicación seria remplazar la técnica de amplificación mediante PCR que actualmente es utilizada, por un método más rápido y de menor costo.

Materiales y métodos

Previamente estas muestras se testearon mediante una PCR puesta a punto en el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, que amplifica parte del gen que codifica para la proteína VP2 (Buonavoglia y cols., 2001). Para la amplificación isotérmica el ADN de las muestras se extrajo mediante incubado a 96 ° C durante 10 minutos, seguido de un enfriamiento inmediato en hielo picado durante 5 minutos y posterior centrifugación. La reacción se realizó en 25 µl totales, conteniendo 2 µl del sobrenadante extraído previamente, 1 µl (40 pmoles) de un par de iniciadores horquilla, 1 µl (5 pmoles) de un par de iniciadores internos (Tabla 1), 2.5 µl de buffer ThermoPol® (NEB) reaction buffer 10x, 3.5 µl de 1.4mM Dntp´s, 1 µl de 8U de Bst DNA polymerase large fragment® (NEB)- y 6.5 µl de agua tridestilada estéril. También se utilizó betaína para estabilizar los fragmentos de ADN.

Tabla 1. Tabla con detalle de secuencia de iniciadores utilizados. Adaptada de Mukhopadhyay y cols., 2012.

Cebadores	posición 5`	posiciòn 3`	secuencia
F3	812	834	GTAAACCATGTAGACTAACACAT
B3	1003	1022	GCACTATAACCAACCTCAGC
FIP			GCTCCTTCAGATTGAGGCAAAGA-CATGGCAAACAAATAGAGC
BIP			GAGTTCAACAAGATAAAAGACGTGG-GGTCTCATAATAGTA

*FIP, iniciador sentido interno. BIP, iniciador antisentido interno

Se incubó en un baño térmico a 65ºC durante 1 hora luego de lo cual se realizó la lectura de la reacción a simple vista luego del agregado de 2 ul de ioduro de propidio (1 mg/ml) a cada tubo. Finalmente las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 1x para corroborar las amplificaciones determinadas a simple vista.

Resultados

Se pudieron observar las muestras positivas como un amplificado de diferentes tamaños produciendo una corrida continua de producto. Sin embargo, las observaciones a simple vista no siempre coincidieron con lo que se reveló tras la corrida electroforética. En las 41 muestras evaluadas, se obtuvo una diferencia del 19.5% entre muestras identificadas como positivas mediante la técnica de PCR y LAMP luego de la corrida electroforética de las muestras (Tabla 2).

Tabla 2. Resultado de las 42 muestras testeadas por PCR y por la técnica en estudio LAMP.

		LAMP		
		+	-	TOTAL
PCR	+	15	3	**18**
		36,59%	7,32%	43,90%
	-	5	18	**23**
		12,20%	43,90%	56,10%
	TOTAL	**20**	**21**	**41**
		48,78%	51,22%	100,00%

Discusión y conclusiones

Los resultados, aunque preliminares, sugieren que la técnica sería una buena opción para un diagnóstico rápido a campo como parte de las técnicas denominadas *"point of care"*, aunque aún podría mejorar la lectura a simple vista utilizando otras tinciones (p.e. SYBR Green). Asimismo, es necesario optimizar la técnica para el porcentaje de 7.32% de muestras que no están siendo detectadas para luego realizar la validación de la técnica como próximo paso.

Bibliografía

Buonavoglia y cols., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. Journal of General Virology (2001), 82, 3021–3025.
H.K. Mukhopadhyay y cols., 2012. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of canine parvovirus DNA directly in faecal specimens. Letters in Applied Microbiology 55, 202–209.
Notomi y cols., 2000. Loop – mediated Isothermal Amplification of DNA. Nucleic acid research 28 (12).
Zanoli y cols., 2013. Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Devices. Biosensors, 3, 18-43.

MISCELÁNEAS

X1- USO DE HIDROGELES PARA SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO

G. Morilla [(1)]; C. Liaudat. [(2)]; V. Capella. [(2)]; N. Rodriguez [(2)]; D. Blois [(2)]; R. Funes [(3)]; S. Babini [(1)]
[(1)]Dpto. Clínica Animal. [(2)]Dpto. Biología Molecular. FAV. UNRC. [(3)]CIP Centro de Inseminación Porcina Rivoira.
gmorilla@ayv.unrc.edu.ar

Introducción

La producción porcina en relación al consumo de su carne presenta demanda tanto nacional como internacional y un factor limitante en la rentabilidad de esta producción es la reproducción; en este sentido la inseminación artificial (IA) es una herramienta indispensable para mejorar la calidad genética, optimizar el número de hembras cubiertas por macho, reducir el contagio de enfermedades infecciosas y disminuir el número de machos en el establecimiento.

La eficiencia productiva en los criaderos de cerdos está íntimamente relacionada a la fertilidad de los machos. En la fecundación natural los espermatozoides son eyaculados y depositados en el útero de la cerda y por movimientos contráctiles del útero, oviducto, y motilidad de los espermatozoides, éstos llegan a la mitad superior del oviducto en 1 hora. Al llegar al oviducto se unen a células epiteliales: lectinas de los espermatozoides con los receptores olisacaridos de las células epiteliales. Esto proporciona un medio óptimo para que el espermatozoide se capacite, y que se produzca la hiperactivación y reacción acrosómica, esta reacción es indispensable para la penetración de la zona pelúcida del ovocito y la fusión de la gameta masculina con la membrana plasmática del ovocito (fecundación).

En las técnicas de reproducción asistida las barreras naturales de selección del tracto de la hembra son obviadas; esto impacta negativamente en la eficiencia reproductiva. Por ello se utilizan técnicas para seleccionar los espermatozoides más aptos, y mejorar los resultados de los métodos de reproducción asistida.

El uso de hidrogeles ha cobrado importancia por su potencial de aplicación, baja toxicidad celular, biocompatibilidad. Estas son estructuras poliméricas que generan una red en un medio líquido por presentar grupos hidrofílicos que le confieren consistencia elástica y suave, simulando la matriz extracelular. El objetivo es evaluar la calidad de los espermatozoides luego de ser expuestos a estos materiales poliméricos como método de selección para ser usados en técnicas de reproducción asistida como la IA.

Materiales y métodos

Se utilizaron hidrogeles con carga neta positiva, polímero copolimerizado de NIPAM con distintas concentraciones de cloruro de 3-((acrilamidopropil) trimetil-amonio, CAT: 5%, 10% y 15%. Para la liberación de los espermatozoides adheridos se utilizó la alternativa de usar medio TALP libre de Ca^{++}. Finalmente, se compararon las características morfológicas y funcionales de la población espermática que se había unido y liberado del hidrogel, de aquella población no unida. Para realizar dicho análisis se utilizaron las siguientes técnicas: 1) Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). 2) Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR), a partir de cortes histológicos de espermatozoides adheridos a los hidrogeles. 3) Microscopía de contraste de fase para evaluar motilidad espermática. 4) Viabilidad celular mediante colorante vital (Eosina). 5) Integridad de la membrana o hinchamiento hipo-osmótico.

Resultados

La adhesión de los espermatozoides a los hidrogeles incrementó en relación al aumento de las cargas positiva de las superficies poliméricas. La técnica MOAR, mostró la adherencia de los espermatozoides (inmersos) al hidrogel. En relación a la motilidad de los espermatozoides, se vió que en las muestras antes de unirse a los hidrogeles un 77,7% tenía muy buena motilidad en masa y el 22,3% era buena. Posterior a la centrifugación el 100% de las muestras mostraban una motilidad muy buena. La tinción con eosina mostró una buena viabilidad celular luego de la exposición a los hidrogeles y posterior liberación. El porcentaje de gametas viables fue superior a las no viables en todas las condiciones estudiadas. La deformación de la membrana plasmática de los espermatozoides en un medio hipoosmótico (HOST) es un indicador de la funcionalidad bioquímica de dicha estructura, requisito fundamental en procesos como la capacitación, la reacción acrosómica y la unión del espermatozoide al óvulo y se vió que el 50% de los espermatozoides liberados sufrieron deformación de la membrana. Figura 1.

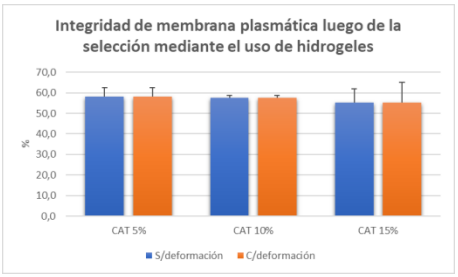


Figura 1. Porcentaje de células con deformación de la membrana plasmática luego de la exposición a los diferentes hidrogeles (CAT 5, 10, 15%). Los valores representan las medias ± error estándar de los porcentajes de células con deformación y sin deformación que se liberaron de los diferentes hidrogeles. Se realizaron tres experimentos independientes.

Discusión y conclusión

Con el uso de la técnica de selección espermática con hidrogeles de carga positiva se logra aislar espermatozoides con alto porcentaje de viabilidad y motilidad. Las técnicas de tinción con eosina y Test hipoosmótico confirman que los espermatozoides liberados son aptos para ser utilizados en técnicas de fertilización asistida.

Estos métodos permiten obtener los mejores espermatozoides. El uso de hidrogeles es una técnica muy valiosa para la selección espermática por su baja toxicidad, biocompatibilidad y el bajo costo de realización.

Bibliografía

Benítez, J. L., Lárez Velásquez, C., y Rojas de Gáscue, B. (2015). Cinética de absorción y transporte del agua en hidrogeles sintetizados a partir de acrilamida y anhídrido maleico. Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 35 (2), 242-253.

Flowers, W.L. (2004). Anatomía y Fisiología del Verraco. Midwest Boar Stud managers Conference II. St. Louis, Mo. http://avancesentecnologiaporcina.com/contenidos/anafeb5.htm

Fuentes, A. R. (2004). Comportamiento reproductivo del verraco. XII Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. INIA-CENIAP. Maracay, Venezuela. Pp. 25-263.

Llóveras, M. (2013). Mayor inseminación artificial en porcinos. Suplemento Campo, pág.8, La Nación, 20-07.

- Mullarney M P; Seery A P; Weiss R A (2006). Polymer 47 3845–55.

Riesenbeck, A. (2011). Review on International Trade with Boar Semen. Reproduction in Domestic Animal, 46 (Suppl. 2), 1-3.

Vega, F. O. (2002). Algunas aplicaciones curiosas de los polímeros super absorbentes. Encuentros en la Biología. Nº 76, Pp 2.

Yeste, M., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Bussalleu, E., Bonet, S. (2010). The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter. Animal Reproduction Science, Vol.119 (3–4). pp 265-274.

X2- DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE ALGUNAS ENFERMEDADES DE IMPORTANCIA EN ABEJAS MELÍFERAS, MEDIANTE VISION ARTIFICIAL

P. Castro P[1], P. Britos P[1], M. Cambarieri[1], L. Vivas[1], S. Abate[2]*
[1]Laboratorio de Informática Aplicada, UNRN (LIA), [2]Centro de Investigaciones y Transferencia Río Negro (CONICET-UNRN).
*sabate@unrn.edu.ar

Introducción

Argentina es uno de los principales exportadores mundiales de miel, cuya producción es una actividad que genera un gran número de puestos de trabajo por su carácter de tipo artesanal. A nivel global, un grupo de enfermedades de las abejas se encuentra en incremento, generando disminución de la producción y mortandad de colmenas. En este sentido, la nosemosis (producida por un microsporidio) se asocia al colapso de colmenas, y la varroasis (producida por un acaro) es un problema de creciente gravedad debido al surgimiento de parásitos resistentes a los fármacos utilizados para su control. Para un manejo eficiente de estas enfermedades se impone la necesidad de un diagnostico precoz, que pudiera incluir la totalidad de las colmenas de un apiario, algo que en la actualidad resulta difícil debido al costo y tiempo que demanda la realización de estos análisis en el laboratorio.
El objeto de este trabajo es proponer una solución basada en técnicas de visión artificial para automatizar el proceso de detección de nosemosis y varroasis, disminuyendo significativamente el costo y el tiempo empleado en el análisis, las variaciones de resultados derivadas del factor "operario" y "laboratorio", así como los errores por cansancio visual del operario.

Materiales y métodos

Se emplearon tecnologías basadas en el lenguaje de programación Java, junto con la librería OpenCV, que implementa los algoritmos de visión artificial capaz de detectar y cuantificar los patógenos mencionados en base a dos descriptores morfológicos: forma y tamaño. Para ello, se obtuvieron las imágenes digitales que fueron procesadas en las siguientes etapas: pre-procesamiento, segmentación, búsqueda de contornos, detección de elipses y por último el recuento de estas elipses. El marco de trabajo para la construcción de la herramienta es Scrum, ya que permite adaptarse de manera fácil a los cambios y responder de manera rápida a los requerimientos solicitados. Para evaluar la eficiencia del programa diseñado, se tomaron muestras de varias colmenas tanto en la comarca Viedma -Patagones y El Bolsón, que se procesaron según métodos estandarizados para diagnóstico de nosemosis y varroasis, las mismas se analizaron en paralelo por el método propuesto de análisis automatizado de imágenes digitales.

Resultados

Se observó congruencia entre los resultados obtenidos por ambos métodos: observación ocular versus visión artificial. La Figura 1 muestra nosemosis por método ocular en cámara de Neubauer (a) y nosemosis por visión artificial en cámara de Neubauer (b). La Figura 2 muestra varroasis por visión ocular (a) y varroasis por visión artificial (b).

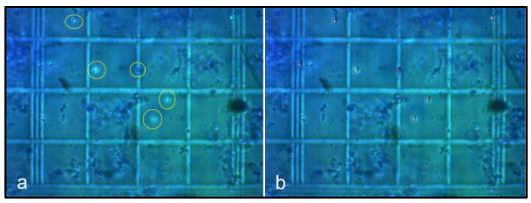


Figura 1.Observación ocular versus visión artificial de nosemosis.

Al comparar el tiempo insumido en la identificación y cuantificación de *Nosema* spp. en procesar 12 muestras, se encontraron diferencias significativas: mientras el análisis ocular por un técnico requirió 51,3 minutos, el análisis por visión artificial logró realizar el conteo e identificación en tan solo 1,2 minutos. Resultados similares se obtuvieron al aplicar el programa de visión artificial en la identificación y cuantificación de varroas sobre 8 imágenes de fondos de colmena con trampa de ácaros por medio de sustancias adherentes.

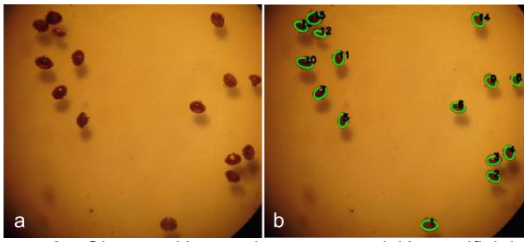


Figura 2. Observación ocular versus visión artificial de varroasis

Discusión y conclusión

Considerando que el método de visión artificial y análisis automatizado propuesto pudo procesar n=12 muestras para diagnóstico de nosemosis en 1,2 minutos, en una jornada de 8hs de trabajo podría procesar 4.800 muestras. Por otro lado, el método tradicional de observación y cuantificación visual de nosemas solo podría procesar un total de 90 muestras en 8 hs de trabajo. Considerando apiarios promedio de 100 colmenas cada uno, en un día de trabajo el método automático propuesto sería capaz de procesar las muestras de todas las colmenas de 48 apiarios, mientras que el método manual no alcanzaría a procesar la totalidad de las colmenas de un solo apiario. Dado que la nosemosis no siempre se manifiesta del mismo modo en todas las colmenas de un apiario, resulta de interés que pudieran analizarse la totalidad de las mismas para tomar medidas de control sanitario eficientes. Si este análisis se traduce en costo económico del análisis de nosemosis, se puede pensar en que el método automatizado podría disminuirlo en 50 veces la fracción del costo debida a gastos por recursos humanos vinculados al análisis (horas de trabajo). Estos dos aspectos (mayor rapidez y menor costo) hacen del método automatizado una herramienta aplicable para estudios epidemiológicos a escala provincial o nacional.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESÚMENES DE TRABAJOS CIENTÍFICOS **PÁGINAS**

BACTERIOLOGÍA

B1- HISTOFILOSIS NERVIOSA EN VAQUILLONA: REPORTE DE UN CASO Y APLICACIÓN DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E INMUNOHISTOQUÍMICA 47

B2- BÚSQUEDA DE *SALMONELLA ENTERICA* EN PERROS CON Y SIN DIARREA DE LA PROVINCIA DE SANTA FE 48

B3- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA DETECCIÓN IN VITRO DE IFN GAMMA BOVINO 49

B4- ESTUDIO RETROSPECTIVO PARA DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORES DE B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y RESISTENTES A COLISTINA AISLADOS DE ANIMALES PARA CONSUMO HUMANO Y MASCOTAS DE ARGENTINA 50

B5- UTILIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EN LECHE CAPRINA 51

B6- MICOBACTINA DE PRODUCCIÓN NACIONAL PARA UTILIZAR EN EL CULTIVO DE *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP *PARATUBERCULOSIS*: PRUEBA BIOLÓGICA PRELIMINAR 52

B7- NUEVOS HALLAZGOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ADENITIS EQUINA Y LA DETECCIÓN DE PORTADORES 53

B8- DETECCIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *STAPHYLOCOCCUS* SPP. AISLADOS DE ANIMALES DE PRODUCCIÓN Y DE COMPAÑÌA EN EL SUR DE SANTA FE 54

B9- CUANTIFICACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM EN CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AISLADOS DE MASTITIS BOVINA 55

B10- EVALUACION DE UNA PCR DE PUNTO FINAL Y DOS METODOS DE EXTRACCION DE ADN PARA EL DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS OVINA 56

B11- MLVA-16 PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DE *BRUCELLA MELITENSIS* A PARTIR DE TEJIDOS CAPRINOS Y OVINOS PROVENIENTES DE LA PROVINCIA DE SAN LUIS 57

B12- MENINGITIS TUBERCULOSA EN UNA TERNERA: REPORTE DE CASO 58

B13- ABORTO BOVINO POR *LISTERIA MONOCYTOGENES*: CONFIRMACIÓN BACTERIOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA 59

B14- LISTERIOSIS EN CAPRINOS: REPORTE DE CASO 60

B15- CONFIRMACIÓN DE UN BROTE DE TUBERCULOSIS AVIAR EN UN CRIADERO DE TRASPATIO 61

B16- CARACTERIZACION ESPACIAL, TEMPORAL Y POR TIPO DE MUESTRA CLÍNICA DE CEPAS DE CAMPYLOBACTER FETUS AISLADAS DE RODEOS BOVINOS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES 62

B17- AISLAMIENTOS MICROBIOLÓGICOS EN LECHES DE CABRAS CON MASTITIS CLÍNICA Y CLÍNICAMENTE SANAS DE PRODUCTORES FAMILIARES DEL NOROESTE DE CÓRDOBA, ARGENTINA 63

B18- MASTITIS TUBERCULOSA EN BOVINOS DE LECHE: REPORTE DE CASOS 64

B19- EFICACIA DE LA OXITETRACICLINA E IMIDOCARBO PARA LA ESTERILIZACIÓN DE ANIMALES PORTADORES DE *ANAPLASMA MARGINALE*. 65

B20- DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *MYCOPLASMA* AISLADOS DE GANADO LECHERO MEDIANTE PCR MÚLTIPLE. 66

B21- DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN DE CÓLERA AVIAR EN PAVOS MEDIANTE PCR 67

B22- IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE CAMPYLOBACTER JEJUNI Y CAMPYLOBACTER COLI DE CONTENIDO CECAL EN AVES DOMÉSTICAS. 68

B23- COLECCIÓN DE CEPAS DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA, GRUPO SANIDAD ANIMAL, EEA INTA BALCARCE 69

B24- GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* AISLADAS EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA. 70

B25- PARATUBERCULOSIS BOVINA: CONFIRMACIÓN DE UN CASO DE INFECCIÓN CONGÉNITA MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS MOLECULARES 71

B26- DETECCION DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* MEDIANTE PCR Y ELISA EN CERDOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS 72

B27- PRIMER AISLAMIENTO DE *MICOBACTERIUM AVIUM* EN UN PERRO MESTIZO EN LA ARGENTINA 73

B28- DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN CANINOS DEL CONURBANO BONAERENSE Y DE VIRASORO, CORRIENTES 74

B29- SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI *LEPTOSPIRA* EN JABALÍES (*SUS SCROFA*) DEL EXTREMO SUR DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES 75

B30- LEPTOSPIROSIS BOVINA: ANALISIS RETROSPECTIVO DE SEROPREVALENCIA EN HEMBRAS BOVINAS EN EL PERIODO 2005-2017 76

B31- EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE UN AISLAMIENTO DE MYCOBACTERIUM BOVIS OBTENIDO DE UN PULMON BOVINO POST INSPECCION EN FRIGORÍFICO 77

B32- *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*: DESCRIPCIÓN DE UN CASO EN BOVINOS Y ASPECTOS DEL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO 78

B33- DETECCIÓN DE *CAMPYLOBACTER FETUS* ADHERIDOS A ESPERMATOZOIDES BOVINOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR 79

B34- RESULTADOS DE LA DETECCION POR PCR DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EN LECHE BOVINA DE RODEOS EN SANEAMIENTO DE LA PROVINCIA DE SANTA FE 80

B35- VALORACION DE RESISTENCIA BACTERIANA EN NEUMONIAS EN BOVINOS DE ENGORDE A CORRAL 81

B36- EXPERIENCIA EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS OVINA 82

B37- RESISTENCIA BACTERIANA EN AISLAMIENTOS PROVENIENTES PIEL Y FANERAS DE CANINOS Y FELINOS DURANTE 2016-2018 83

EPIDEMIOLOGÍA

E1- RELEVAMIENTO DE ENFERMEDADES VENÉREAS EN PEQUEÑOS Y MEDIANOS PRODUCTORES DE LA COSTA DEL RÍO URUGUAY 87

E2- ESTUDIO DE LOS DIAGNÓSTICOS DE BRUCELOSIS BOVINA REALIZADOS DURANTE EL PERIODO 2015 - 2016 EN LA CUENCA LECHERA DE TRANCAS, TUCUMÁN, ARGENTINA 88

E3- APLICACIÓN DE UN MODELO BAYESIANO PARA ESTIMAR LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y PREVALENCIA DE TRES PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS PORCINA, SIN PRUEBA DE REFERENCIA 89

E4-ENFERMEDADES VENEREAS EN TOROS: PREVALENCIA EN EL SUDOESTE DE LA REGION PAMPEANA 2000-2017 90

E5- VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA EN ARGENTINA. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PERÍODO 2010-2016 91

E6- CASUÍSTICA DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS BOVINAS CONFIRMADAS MEDIANTE PCR EN UN LABORATORIO DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA DURANTE LOS AÑOS 2016 Y 2017 92

E7- LEPTOSPIROSIS BOVINA: CASUISTICA DE MORTANDAD DE TERNEROS DIAGNOSTICADA EN EL INTA BALCARCE (2000-2017) 93

E8- NEOSPOROSIS: SEROPREVALENCIA EN TAMBOS BOVINOS DE LA PROVINCIA DE SAN LUIS 94

E9- RELEVANCIA EN EL MANTENIMIENTO DE UNA COLECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* 95

E10- PREVALENCIA A *TRITRICHOMONAS FOETUS* EN TOROS DE UN RODEO COMERCIAL Y SU RELACIÓN CON LAS TASAS DE PREÑEZ 96

E11- EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEPTOSPIROSIS EN BOVINOS DE CRÍA DE LA REGIÓN SUDESTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES 97

E12- BRUCELOSIS BOVINA: 15 AÑOS DE TRABAJO CON PRODUCTORES FAMILIARES DE LA PROVINCIA DE MISIONES, ARGENTINA 98

E13- RELEVAMIENTO DE BRUCELOSIS EN CABRAS DE PRODUCTORES FAMILIARES DEL NOROESTE DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA, ARGENTINA. 99

E14- INFLUENZA EQUINA: HALLAZGOS EPIDEMIOLOGICOS Y MOLECULARES DEL BROTE OCURRIDO EN ARGENTINA EN 2018 100

E15- REGISTRO DE *OLIGORYZOMYS LONGICAUDATUS* Y ANÁLISIS SEROLÓGICO FRENTE A VIRUS ANDES EN LA PATAGONIA NORTE EXTRA-ANDINA 101

E16- SEROPREVALENCIA DE NEOSPOROSIS EN PEQUEÑOS RUMIANTES MEDIANTE IFI Y ELISA DE COMPETICIÓN BASADO EN LA PROTEÍNA RECOMBINANTE SAG1 102

E17- RELEVAMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS OBTENIDOS EN EL LABORATORIO ESCUELA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DURANTE 2016-2018 103

E18- INFORME PRELIMINAR SOBRE INESTABILIDAD DE LA PREVALENCIA DE TRICHOMONOSIS, EN LA ZONA DEPRIMIDA DEL SALADO, PROVINCIA DE BUENOS AIRES 104

E19- IMPACTO DE LAS ENFERMEDADES VENÉREAS EN UN ESTABLECIMIENTO DEL ESTE DE LA PROVINCIA DE FORMOSA. 105

E20- IMPORTANCIA DE LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN FRIGORÍFICOS OVINOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS. 106

IMNUNOLOGÍA

I1- DESARROLLO DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO INDIRECTO (ELISAI) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS DE LOS BOVINOS: RESULTADOS PRELIMINARES 109

I2- COMPARACION ENTRE UN ELISA INDIRECTO EN SUERO Y UN ELISA EN LECHE PARA EL 110

DIAGNOSTICO DE PARATUBERCULOSIS EN VACAS DE TAMBO: RESULTADOS PRELIMINARES.

I3- EVALUACIÓN PRELIMINAR DE UN TEST DE POLARIZACIÓN DE LA FLUORESCENCIA EN MICROPLACAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS PORCINA 111

I4- DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSIS EN PERROS: EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA *IN-HOUSE* 112

I5- EVALUACION DE UNA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA CON PROTEÍNA NATIVA P30 DE *TOXOPLASMA GONDII* PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS CAPRINA 113

I6- DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS BOVINA: COMPARACIÓN DE LA PERFORMANCE DIAGNÓSTICA DE DOS ELISAS (PROTEINA EXTRACTIVA VS RECOMBINANTE). 114

I7- EVALUACION DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO INDIRECTO (ELISAI) PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLOGICO DE LA BRUCELOSIS CAPRINA 115

I8- PRUEBA DE ANILLO EN LECHE UN HERRAMIENTA DIAGNOSTICA 116

I9- UTILIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ELISA, COMPLEMENTARIA A LA INTRADERMOREACCION, PARA EL SANEAMIENTO DE RODEOS LECHEROS BOVINOS CON TUBERCULOSIS 117

I10- PRUEBA DE POTENCIA DE TUBERCULINAS ELABORADAS CON MICOBACTERIAS AMBIENTALES AISLADAS DE MUESTRAS DE BOVINOS 118

I11- PRUEBAS CON SENSITINAS ELABORADAS A PARTIR DE MICOBACTERIAS AMBIENTALES AISLADAS DE BOVINOS APLICADAS EN UN RODEO POSITIVO A TUBERCULOSIS. 119

I12- COMPARACIÓN DE DIFERENTES PRUEBAS SEROLÓGICAS UTILIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS BOVINA, EN ARGENTINA 120

I13- EVALUACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES EN LA PRUEBA DE INTERFERÓN GAMMA EN BOVINOS TUBERCULOSOS NO REACTORES A LA PRUEBA TUBERCULÍNICA 121

I14- EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE ROSA DE BENGALA MODIFICADA EN EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS PORCINA 122

ENFERMEDADES METABÓLICAS Y CARENCIALES

M1- CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA PARA CONSUMO HUMANO, DPTO. DE POCHO, PROVINCIA DE CÓRDOBA. 125

M2 - RELEVAMIENTO DEL PERFIL MINERAL DEL GANADO CAPRINO EN 5 PROVINCIAS ARGENTINAS 126

M3- PERFIL MINERAL EN EQUINOS DE RAZA PERUANO DE PASO EN EL VALLE DE LERMA (PCIA. DE SALTA). RESULTADOS PRELIMINARES 127

M4- CORRELACIÓN ENTRE SELENIO EN SANGRE ENTERA Y COBRE EN SUERO DE BOVINOS 128

M5- VARIACIONES DE ZN EN TERNEROS INFECTADOS CON *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA. COMUNICACION* 129

M6- HIPOVITAMINOSIS A CONGENITA EN BOVINOS: PRIMERA CONFIRMACIÓN DIAGNÓSTICA EN ARGENTINA. COMUNICACION 130

M7- EFECTO DE SUPLEMENTACIÓN INYECTABLE CON SELENIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA Y EL PESO EN TERNEROS AL PIE DE LA MADRE 131

PARASITOLOGÍA

P1- PRIMERA DESCRIPCIÓN DE *BABESIA GIBSONI* (*SENSU STRICTO*) EN PERROS DE ARGENTINA 135

P2- PRIMERA DETECCIÓN MOLECULAR DE *EIMERIA* SPP. Y *E. TENELLA* EN POLLOS INFECTADOS DE ARGENTINA 136

P3- DESCRIPCIÓN DE UN CASO DE *TRYPANOSOMA EVANSI* EN UN CANINO DE LA LOCALIDAD DE MONTE CASEROS, PROVINCIA DE CORRIENTES. 137

P4- SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PCR COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LA TRICHOMONOSIS VENÉREA BOVINA 138

P5- LÍMITE DE DETECCIÓN DE *TRITRICHOMONAS FOETUS* MEDIANTE PCR Y CULTIVO CON OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA 139

P6- IDENTIFICACION DE *SARCOCYSTIS* SPP. EN JABALIES (*SUS SCROFA*) DEL NOROESTE PATAGÓNICO 140

P7- EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIHELMINTICA EN INVERNADAS BOVINAS DE LA REGIÓN PAMPEANA CENTRAL DE ARGENTINA (RESULTADOS PRELIMINARES) 141

P8- DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE FELIDOS SILVESTRES MANTENIDOS EN CAUTIVIDAD EN LA REGIÓN DEL NORDESTE ARGENTINO 142

P9- EFECTO ANTIHELMÍNTICO *IN VITRO* DE EXTRACTOS VEGETALES DE LA FAMILIA *FABACEAE* SOBRE HUEVOS Y LARVAS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* 143

P10- *TRYPANOSOMA VIVAX* EN UN RODEO LECHERO: SEGUIMIENTO Y ESTUDIO DE UN CASO 144

P11- DIAGNÓSTICO DE LA RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA EN PEQUEÑOS ESTRÓNGILOS DE LOS EQUINOS. EL PERÍODO DE REAPARICIÓN DE HUEVOS EN ANIMALES JÓVENES Y EN ADULTOS 145

P12- MIGRACIÓN DE ADULTOS DE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* ENTRE BOVINOS EN POTREROS CON DIFERENTE CARGA ANIMAL. RESULTADOS PRELIMINARES 146

P13- IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *TRICHINELLA* PROVENIENTES DEL SUDOESTE BONAERENSE 147

P14- EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE *TRITRICHOMONA FOETUS* 148

P15- DETECCIÓN DE *ASCARIS LUMBRICOIDES* EN *ALOUATTA CARAYA* RESIDENTES EN LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE CORRIENTES Y SU POTENCIAL ACCIÓN ZOONÓTICA 149

P16- DIAGNÓSTICO DIRECTO DE TRICHINELLOSIS PORCINA: CALIDAD DEL PROCEDIMIENTO A TRAVÉS DE MUESTRAS DE PROFICIENCIA 150

P17- CARACTERIZACION *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD DE IVERMECTINA SOBRE *HAEMONCHUS CONTORTUS* 151

P18- TINCIÓN DE HUEVOS EN MATERIA FECAL COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA LA HAEMONCHOSIS OVINA 152

P19- HALLAZGO DE CÁPSULAS OVÍGERAS POR FLOTACIÓN SIMPLE,

UN CASO DE DIPILIDIASIS CANINA 153

P20- TENIASIS POCO FRECUENTES EN FELINOS DOMÉSTICOS 154

P21- TRICHINELLOSIS EN JABALÍES DE LA PATAGONIA NORESTE: ESTUDIO MULTICÉNTRICO 155

P22- DETECCIÓN MEDIANTE DIGESTIÓN ARTIFICIAL E IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE DE *TRICHINELLA* EN MUESTRAS DE CERDOS, JABALIES Y PRODUCTOS PORCINOS EN ARGENTINA 156

P23- DETERMINACIÓN DE LOS GÉNEROS DEL ORDEN STRONGYLIDA PRESENTES EN ESTABLECIMIENTOS DE PRODUCCIÓN EQUINA DE LA REGIÓN CENTRAL DE ARGENTINA 157

P24- CARACTERIZACIÓN DE LA CISTEIN PROTEASA 8 EN DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *T. FOETUS* DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES 158

P25- IDENTIFICACIÓN DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EN LECHONES DE GRANJAS INTENSIVAS Y SU ASOCIACIÓN CON LOS DISTINTOS TIPOS DE MANEJO 159

P26- IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *SARCOCYSTIS GIGANTEA* EN UN OVINO 160

P27- PARASITOS INTERNOS Y EXTERNOS EN BOVINOS DE LECHE EN UNA ESCUELA AGROPECUARIA EN CORRIENTES, ARGENTINA 161

PATOLOGÍA CLÍNICA

PC1- FASTEST® EHRLICHIA CANIS E INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN EL DIAGNÓSTICO DE EHRLICHIOSIS CANINA 165

PC2- VARIACIONES HEMATOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS EN PERROS CON HEPATOZOONOSIS 166

PC3- MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO 167

PC4- UTILIDAD DEL ESTUDIO DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) EN EL DIAGNÓSTICO DE DISTINTAS PATOLOGÍAS DEL SNC EN BOVINOS: DESCRIPCIÓN DE CASOS 168

PC5- PARATUBERCULOSIS BOVINA: ASOCIACIÓN ENTRE EL ÍNDICE UREA Y LA DENSIDAD ÓPTICA DE LOS SUEROS EN LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO. 169

PC6- LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA ASOCIADA A UN CUADRO DE PIODERMIA PROFUNDA: DESCRIPCIÓN DE UN CASO CLÍNICO. 170

PC7- ESTUDIO DEL PERFIL PROTEICO ENPACIENTESCANINOS CON SIGNOLOGIA DE LESION RENAL 171

PC8- RESULTADOS PRELIMINARES DE LA MEDICIÓN DE GASES EN SANGRE ARTERIAL DE CANINOS BAJO ENTRENAMIENTO AERÓBICO. 172

PC9- DIAGNÓSTICO DE MYCOPLASMA HEMOTRÓFICO SPP. OCURRENCIA EN PACIENTES FELINOS QUE CONCURREN AL HOSPITAL ESCUELA FCV. UNLP.ESTUDIO PRELIMINAR. 173

PC10- COMPORTAMIENTO DE LA ACTIVIDAD SÉRICA DE GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA (GGT) EN TERNEROS NEONATOS: ESTUDIO PRELIMINAR 174

PC11- IMPORTANCIA EN LA APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA DE CASOS CLÍNICOS A TRAVÉS DEL EXAMEN DEL SEDIMENTO URINARIO 175

PC12- CRISTALURIA Y UROLITIASIS POR CISTINA EN CANINOS MACHOS DE RAZA BULLDOG. 176

PC13- ESTUDIO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN ERITROCITOS CANINOS. LA QUIMIOLUMINISCENCIA COMO MÉTODO COMPLEMENTARIO DE DIAGNÓSTICO. 177

PC14- UROLITIASIS PERSISTENTE COMPLICADA EN CANINO ASOCIADA A INFECCIÓN URINARIA POR *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* 178

PATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

PT1-DESCRIPCIÓN DE CASO DE FOTOSENSIBILIZACIÓN SECUNDARIA POR *LANTANA CAMARA* EN SAN LUIS 181

PT2-CARCINOMA MAMARIO MIXTO MALIGNO Y CARCINOMA INFLAMATORIO: FACTORES PRONOSTICOS 182

PT3-EXPRESIÓN DE CATEPSINA D Y SU ASOCIACION A METASTASIS EN LOS DISTINTOS TIPOS HISTOPATOLÓGICOS EN CANCER MAMARIO CANINO. ESTUDIO PRELIMINAR 183

PT4- FRECUENCIA DE INMUNOMARCACION NO DESEADA Y SU IMPACTO EN EL DIAGNOSTICO DE ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA 184

PT5- ALFA-MANOSIDOSIS EN UN TERNERO ANGUS EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES 185

PT6- BROTE DE FOTOSENSIBILIZACION EN OVINOS DE RIO NEGRO, ARGENTINA 186

PT7- DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES EN LECHE DE PRODUCTORES FAMILIARES DE LA PROVINCIA DE MISIONES. 187

PT8- FOTOSENSIBILIZACIÓN EN BOVINOS EN SISTEMAS PASTORILES:ANÁLISIS RETROSPECTIVO (1998-2018) 188

PT9- DETECCION DE LA MUTACIÓN RESPONSABLE DE A-MANOSIDOSIS EN BOVINOS CRUZA ANGUS DE ARGENTINA 189

VIROLOGÍA

V1- EVALUACIÓN DE UN ENSAYO DE POLARIZACIÓN DE LA FLUORESCENCIA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ANEMIA INFECCIOSA EN EQUINOS DE ARGENTINA. 193

V2- DESARROLLO DE UNA REAL-TIME PCR BASADA EN SYBR GREEN
PARA LA DETECCIÓN DE PARVOVIRUS PORCINO Y VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY 194

V3- TOXICIDAD ASOCIADA A IVERMECTINA EN LA PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN VIRAL EN EL DIAGNÓSTICO DE ARTERITIS VIRAL EQUINA 195

V4- DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR BOHV-1 Y BVDV EN BOVINOS INMUNIZADOS CON VACUNAS REPRODUCTIVAS 196

V5- CO-INFECCIÓN DE *TRYPANOSOMA EVANSI* Y EL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EN EQUINOS DE LA PROVINCIA DE FORMOSA, ARGENTINA. 197

V6- DETECCIÓN DE LOS BIOTIPOS CP Y NCP DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN UN NEONATO BOVINO CON UN CUADRO NEUROLOGICO 198

V7- LEUCOSIS ENZÓOTICA BOVINA. REPORTE DE UN CASO CLÍNICO EN MISIONES. 199

V8- LA IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES VIRALES DE LOS EQUINOS PARA LA INDUSTRIA HÍPICA ARGENTINA 200

V9- DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE ARTERITIS EQUINA EN MUESTRAS DE SEMEN EQUINO EN EL PERÍODO COMPRENDIDO ENTRE LOS AÑOS 2010-2018 201

V10- DIAGNOSTICO DE ENFERMEDAD DE AUJESZKI EN PORCINOS EN LAS LOCALIDADES DE VINALITO, PALMA SOLA Y SAN PEDRO DE LA PROVINCIA DE JUJUY 202

V11- DETECCIÓN Y ESTABILIDAD DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA 1B EN LEUCOCITOS DE BOVINOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS 203

V12- EVALUACION DE UN “KIT” DE ELISA COMPETITIVO CONTRA LA PROTEINA 26 DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA. 204

V13- UTILIZACIÓN DE TESTS CROMATOGRÁFICOS PARA LA PESQUISA DE CHLAMYDIAS EN AVES COMERCIALIZADAS EN LA FERIA NUEVA POMPEYA 205

V14- LEUCOMETRÍA EN BOVINOS INFECTADOS Y NO INFECTADOS POR EL VIRUS DE LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA 206

V15- ESTANDARIZACION DE ENSAYOS DE PCR PARA LA DETECCION DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMINATES (CAEV Y MVV) A PARTIR DE DISTINTOS TIPOS DE MUESTRAS. 207

V16- DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE RETROVIROSIS FELINAS POR PCR ANIDADA Y SU APLICACION EN LA TIPIFICACIÓN DE VIF. 208

V17- DISEÑO DE PCR PARA DIFERENCIAR CEPAS SALVAJES DE VACUNALES DE PARVOVIRUS CANINO 209

V18- PRIMER CASO DE FIEBRE CATARRAL MALIGNA EN BOVINOS DE LA PATAGONIA ARGENTINA 210

V19- DETECCION DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA Y DE MICOPLASMA EN MUESTRAS DE SUERO FETAL BOVINO IRRADIADO 211

V20- DIAGNOSTICO DE INMUNODEFICIENCIA FELINA Y LEUCEMIA FELINA MEDIANTE LA TECNICA DUPLEX PCR 212

V21- LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN TAMBOS DE AGRICULTURA FAMILIAR 213

V22- APLICACIÓN DE LA TECNICA DE AMPLIFICACION ISOTERMICA MEDIANTE HORQUILLAS (LAMP) PARA EL DIAGNOSTICO DE PARVOVIRUS CANINO 214

MISCELÁNEAS

X1- USO DE HIDROGELES PARA SELECCIÓN DE ESPERAMTOZOIDES DE CERDO 217

ASOCIACIÓN ARGENTINA DE VETERINARIOS DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO

XXII Reunión Científico Técnica

Carmen Maffrand, Anabela Benzoni y Gabriel Magnano
Coordinadores

www.aavld.org.ar

Asociado a: World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians
WAVLD

El presente libro contiene los resúmenes de la XXII Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. El objetivo de esta recopilación es brindar un material que se constituya en un importante aporte científico y que marque una fuerte impronta —tanto por la cantidad de resúmenes incluidos, como por su calidad—. Además, se pretende enriquecer los conocimientos en cuanto a los criterios diagnósticos, aplicación de nuevas tecnologías y controles de calidad para dar mayor confianza a los resultados de laboratorio.

Con este aporte, se promueve el desarrollo científico y tecnológico de los laboratorios de diagnóstico veterinario. Por lo tanto, se encuentra dirigido a profesionales y científicos dedicados al campo de las Ciencias Veterinarias.

ISBN 978-987-688-310-8

e-book

UniRío editora

Universidad Nacional de Río Cuarto