

Capítulo XXXV

Técnicas convencionales y nuevas estrategias para el diagnóstico de enfermedades infecciosas

Dubraska V. Díaz-Campos

En Medicina Veterinaria de grandes animales, el laboratorio es principalmente usado para la prevención y establecimiento de medidas de bioseguridad. El diagnóstico de las enfermedades más comunes en una zona geográfica es imprescindible para el diseño de planes de vacunación y planes de medidas profilácticas. Por otro lado, un gran número de enfermedades que afecta a los rumiantes son enfermedades zoonóticas o de declaración obligatoria, lo que amerita un diagnóstico exhaustivo y de calidad. En algunas ocasiones, la presentación de síndromes clínicos comúnmente asociados a causas multifactoriales, se convierte en un desafío para el clínico, microbiólogo y propietario de los animales.

Si bien es cierto que en los últimos años han aparecido nuevas técnicas diagnósticas y se han mejorado muchas otras, también es cierto que técnicas tradicionales mantienen su posición dentro de los laboratorios. En algunos casos, es abrumador para el veterinario de campo y el veterinario microbiólogo escoger la técnica diagnóstica más adecuada y que represente un gasto mínimo para el propietario de los animales. En muchos casos es necesario diseñar una estrategia de muestreo basada en los signos clínicos y en la epidemiología de las enfermedades consideradas en el diagnóstico diferencial. Con frecuencia, una buena estrategia es iniciar con pocas técnicas de diagnóstico e ir seleccionando otras, dependiendo de los resultados primarios. Otra limitante, para el veterinario microbiólogo y el clínico, es no contar con la tecnología contemporánea, disponible en otros laboratorios. El Estado y las asociaciones de ganaderos deben invertir en nuevas tecnologías para el crecimiento de sus laboratorios de diagnóstico. Esto garantizará la adecuada prevención y control de enfermedades que a la larga se traduce en una industria ganadera rentable.

EVALUACIÓN CLÍNICA, SELECCIÓN DEL LABORATORIO Y TOMA DE MUESTRAS

Diagnósticos erróneos, tales como falsos negativos, cultivos bacterianos con sobre crecimiento de flora normal o contaminante y resultados inconclusos, son diaria-

mente observados en los laboratorios de diagnóstico veterinario. Tres elementos están asociados a estos resultados indeseables: una historia y evaluación clínica deficiente, fallas en la toma y transporte de muestras clínicas, y los errores al escoger la prueba diagnóstica (Figura 1). En la mayoría de los casos, el enfoque en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas depende inicialmente de la evaluación clínica y epidemiológica; en caso que el diagnóstico presuntivo y diferencial sea incorrecto, la toma de muestras y la selección de las pruebas serán erróneas. Por lo tanto, el abordaje de un rebaño debe basarse en las observaciones clínicas del médico veterinario, quien dirigirá la toma de muestras y la selección de las pruebas diagnósticas, en conjunto con el veterinario microbiólogo.

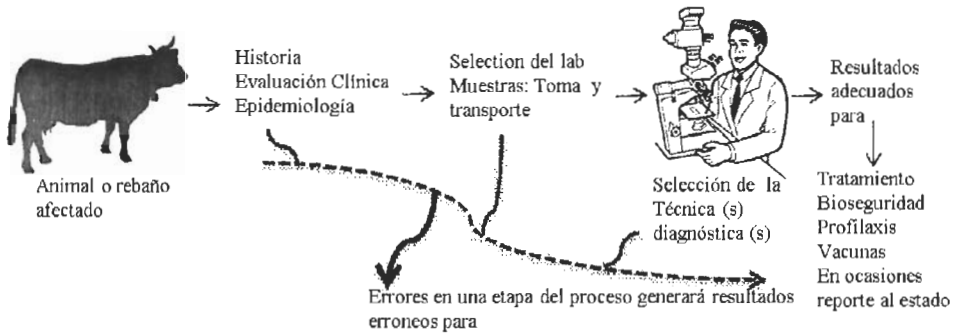


Figura 1. Flujo en el proceso de diagnóstico de enfermedades infecciosas.

La correcta identificación del agente infeccioso también dependerá en gran medida de la selección del laboratorio; en ocasiones, el costo del servicio de diagnóstico es considerado, sin embargo, otros factores deberían tener mayor peso. El laboratorio debe ser especializado en el diagnóstico de enfermedades infecciosas bovinas, su personal debe estar debidamente entrenado no solo para realizar las pruebas, sino que también debe ser capaz de ofrecer asesoría técnica. En lo posible, el laboratorio debe estar acreditado por el organismo competente del país. Los laboratorios de diagnóstico microbiológico ofrecen orientación para la toma y transporte de muestras dependiendo de las técnicas que son realizadas.

El ejercicio de tomar muestras clínicas para ser procesadas por el laboratorio microbiológico se debe regir por ciertos principios básicos (Markey *et al.*, 2013; Griffin, 2012). El establecimiento de un diagnóstico diferencial es de gran ayuda al momento de la toma de muestras. Con frecuencia, la lista que constituye el diagnóstico diferencial incluye agentes bacterianos, virales y parasitarios. La toma de muestras y el transporte del espécimen clínico debe ser cuidadoso, garantizando la integridad del material que va a ser procesado. Para recomendaciones específicas para la toma de muestras y medios de transporte para cultivo bacteriano y micológico el lector puede dirigirse al Cuadro 1. Por lo general, el clínico se encontrará frente a tres escenarios: animales fallecidos (muerte súbita o eutanasia), animales clínicamente enfermos que aún se encuentran con vida y animales saludables que se evalúan como parte de programas preventivos.

Cuadro 1

Sistemas de transporte para las muestras que requieren cultivo bacteriano: recomendaciones básicas

Tubos Port-A-Cul®: excelentes para tejidos e hisopos. Buenos para el transporte de microorganismos aeróbicos, anaerobios, mycobacterianos, <i>Mycoplasma</i> spp y otros fastidiosos (la muestra debe estar dentro del agar).	Viales Port-A-Cul®: la mejor opción para fluidos estériles, tales como fluidos articulares, líquido cefalorraquídeo. Buena alternativa para otros fluidos cuando se sospecha de anaeróbicos, <i>Mycoplasma</i> spp, mycobacterias y hongos si la muestra no se procesará en corto tiempo.
Hisopos: Un hisopado nunca debe recolectarse si biopsias, fluidos, heces o tejidos están disponibles. Si no hay otra opción usar sistemas de tubo plástico con medio de transporte e hisopo (Culturette System ® BBL). El uso de hisopados es recomendado en el caso de otitis, ojos, infecciones profundas y diagnóstico del tracto reproductivo. Hisopos sin medio de transporte no deben ser procesados.	Botellas para cultivo de sangre: excelentes para sangre en casos de septicemias. También son excelentes para el transporte de líquido cefalorraquídeo y fluido articular. Estas muestras no deben refrigerarse, mantenerlas a temperatura ambiente.
Tubos de vidrio (vacutainer): Buenos para fluidos (leche, orina, otros) que solo requieren cultivo aeróbico, sin embargo si hay suficiente fluido las bacterias anaeróbicas podrán sobrevivir en la parte inferior del tubo. La muestra debe procesarse en corto tiempo.	Envases plásticos con tapa enroscable: recomendados para heces, y otras muestras no estériles Bolsas plásticas (Ejem. Whirl-pak): buenas para el transporte de tejidos colectados de necropsias (se recomienda al menos 5 gramos)
En ocasiones se deben sembrar las muestras en el campo. En el caso de biopsias por su tamaño pequeño y debido a que algunas bacterias se aíslan hay más probabilidades cuando se siembran de inmediato (<i>Moraxella bovis</i> , <i>Mycoplasma</i> spp). El laboratorio puede proveer de los medios de cultivo adecuados y dar instrucciones de cómo inocular los mismos.	

En todo caso se deben considerar ciertas recomendaciones generales al momento de la toma de muestras (Hodgson *et al.*, 2008): 1. Para el diagnóstico de enfermedades virales, en ocasiones, se requiere de un medio de transporte especial que elimine la flora bacteriana normal y mantenga el virus en condiciones óptimas (ej. hisopados nasales). 2. Cuando se toman muestras para cultivo bacteriano se debe tener conocimiento de la flora normal microbiana, la técnica debe ser apropiada y los resultados interpretados considerando dicha flora. 3. El tamaño o cantidad de la muestra podrían ser de importancia en la mayoría de los casos, el uso de hisopos limita el tamaño de la muestra. 4. Para cultivo bacteriano, microscopía electrónica y aislamiento viral se deben coleccionar tejidos y fluidos siempre que sea posible; los hisopos son la última alternativa. 5. Si se realiza una necropsia, el tejido coleccionado deber tener un mínimo de 2cm x 2cm preferiblemente; las muestras deben ser colocadas en bolsas de transporte (Ej. Ziploc®) y los fluidos pueden ser transportados en tubos estériles. 6. Si es posible, las muestras deben ser tomadas antes de administrar antibióticos. Es importante mantener las muestras refrigeradas (aproximadamente a 4°C) y transportarlas al laboratorio lo más rápido posible para su procesamiento en las siguientes 24-48 horas. 7. La histopatología es una herramienta de diagnóstico indispensable. Las lesiones observadas pueden descartar enfermedades infecciosas (Ej. tumores), confirmar hallazgos microbiológicos y orientar la ejecución o interpretación de otras técnicas diagnósticas. Colocar piezas de tejido en preservativos (Ej. Formalina 10%).

ENFRENTANDO SÍNDROMES CLÍNICOS

Diarrea en becerros

La presencia de diarrea en becerros es un problema frecuente, siendo en muchas ocasiones que el causal es de origen multifactorial. Las pérdidas económicas pueden llegar a ser significativas cuando son afectados múltiples animales. La historia y evaluación clínica deben ser realizadas cuidadosamente considerando la edad de los animales afectados. La decisión de las pruebas microbiológicas a realizar, así como el uso de terapia empírica, dependerá de la evaluación inicial. Con frecuencia, las causas de diarrea en becerros están asociadas a fallas en el consumo de calostro (fallas en la transferencia de inmunidad pasiva). Debido a que el origen puede ser multifactorial, el logro de un diagnóstico definitivo puede constituir un desafío para el veterinario y en onerosos gastos para el propietario de los animales.

Cuando se realiza una necropsia, es importante examinar detalladamente el tracto gastrointestinal. Además, al evaluar el sistema respiratorio, los animales afectados pueden morir a causa de septicemia, así que las lesiones podrían también observarse en pulmones y otros tejidos. Cuando se colectan muestras durante la necropsia es importante incluir segmentos del intestino que se encuentra afectado. Se debe utilizar suturas o en su defecto pabilo, para amarrar a ambos lados de donde se observa el tejido lesionado, cortando y colocando el segmento intestinal en una bolsa de transporte. De esta manera, se mantiene el contenido intestinal y el tejido necesario para las pruebas. Esta muestra es útil para realizar cultivo bacteriano (salmonelosis, colibacilosis, clostridiosis, etc.), identificación viral (rotavirus, coronavirus) y parasitología (Cryptosporidiosis, Coccidiosis). *Salmonella* spp puede ser difícil de cultivar en el laboratorio, por lo que se recomienda incluir nódulos linfáticos mesentéricos. Cuando los animales están vivos se deben tomar heces frescas, mantenerlas refrigeradas y llevarlas al laboratorio en un corto periodo de tiempo, preferiblemente en menos de 24 horas.

En el Cuadro 2 se mencionan los patógenos más comunes asociados a la diarrea en becerros y se describen algunas estrategias a considerar al momento de escoger las técnicas de diagnóstico. La edad de los animales, los signos clínicos y la epidemiología son importantes para la selección de las técnicas. La histopatología puede ofrecer una guía para la selección de las pruebas confirmatorias, así como confirmar resultados de las pruebas microbiológicas. En la actualidad, muchos laboratorios veterinarios ofrecen a sus clientes paneles de pruebas diagnósticas que abarcan los patógenos más comunes.

Enfermedades respiratorias

En bovinos, las enfermedades respiratorias están asociadas generalmente a causas multifactoriales. En animales jóvenes, las enfermedades del tracto respiratorio se asocian generalmente con neumonía. Signos clínicos tales como estornudos, tos, disnea y cianosis evidencian una enfermedad respiratoria del tracto anterior. Al momento de la evaluación clínica, se puede delimitar si los tejidos afectados corresponden al tracto respiratorio anterior o se encuentran en la cavidad torácica. Antes de tomar muestras para el diagnóstico microbiológico, especialmente para el cultivo bacteria-

Cuadro 2

Causas más comunes asociadas a diarreas en los becerros y estrategias a considerar para su diagnóstico

Causas	Estrategias
<p style="text-align: center;"><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC) afecta becerros durante los tres primeros días de vida, en ocasiones se extiende hasta por 7 días. Generalmente se observa diarrea profusa, y en casos severos, enteritis hemorrágica.</p>	<p>Cultivo aeróbico solo permite identificar la presencia de <i>E. coli</i> (flora normal). Pruebas adicionales, tal como PCR son necesarias para identificar específicamente cepas de ETEC.</p>
<p style="text-align: center;"><i>Salmonella</i> spp^b</p> <p>Diferentes especies de <i>Salmonella</i> han sido asociadas a diarrea profusa en becerros, así como a septicemia, afectando incluso animales adultos.</p>	<p>Es indicado el cultivo aeróbico (con enriquecimiento) de heces o tejidos. Si se desea conocer la especie, los aislamientos deben ser enviados a laboratorios de referencia para la identificación del serogrupo.</p>
<p style="text-align: center;"><i>Clostridium perfringens</i></p> <p><i>C. perfringens</i> B y C, generalmente afecta animales menores a 10 días. Comúnmente se observa muerte súbita y enteritis hemorrágica.</p>	<p>Cultivo anaeróbico permite identificar la presencia de <i>C. perfringens</i> (flora normal). Pruebas adicionales, tal como PCR son necesarias para identificar específicamente cepas del tipo B o C. Algunos laboratorios ofrecen pruebas para la detección de las toxinas. Neutralización de las toxinas para tipificar <i>C. perfringens</i> en ratones era una técnica usada anteriormente.</p>
<p style="text-align: center;">Rotavirus y Coronavirus</p> <p>Rotavirus es la causa más común de diarrea en becerros entre los 4 a 14 días de vida. Coronavirus afecta animales desde los 4 hasta los 30 días.</p>	<p>Histopatología y microscopía electrónica (ME) son buenas opciones para el diagnóstico, sin embargo, ME no está disponible en la mayoría de los laboratorios. Otros métodos, tales como inmunofluorescencia y ELISA están disponibles en algunos laboratorios.</p>
<p style="text-align: center;">Diarrea viral bovina^a</p> <p>Animales afectados pueden presentar úlceras y lesiones en el paladar, además de diarrea y otros signos sistémicos.</p>	<p>Existen diferentes estrategias de diagnóstico. Cuando el animal exhibe signos clínicos se recomienda la detección del virus. Aislamiento viral en cultivos celulares (tejidos afectados), PCR y detección del antígeno viral mediante IF o inmunohistoquímica (capa leuco-plaquetaria o tejidos).</p>
<p style="text-align: center;">Cryptosporidiosis^b / Coccidiosis</p> <p><i>Cryptosporidium</i> spp generalmente afecta animales entre 1 a 4 semanas de edad, se observan heces blandas o líquidas, en algunos casos con muco y sangre. Diarrea asociada a <i>Coccidia</i> spp es observada en animales mayores de 3-4 semanas, usualmente diarrea sanguinolenta con tenesmo.</p>	<p>Para el diagnóstico se requieren heces y se realiza un test de flotación. La identificación de <i>Cryptosporidium</i> spp puede ser difícil debido al pequeño tamaño de los oocitos. Por lo cual, en la actualidad, se recomienda el uso de una prueba de ELISA que está disponible comercialmente.</p>

Nota: ^a Indica que la enfermedad está asociada a otros signos clínicos de importancia que no se han incluido en la tabla. ^b Indica que son enfermedades de importancia zoonótica.

no, se debe considerar el potencial de colectar flora normal. Los hisopados nasales no son recomendados para el diagnóstico bacteriológico, al menos que se quiera identificar un microorganismo en particular como el *Mycoplasma* spp. Con hisopados nasales se colectaran bacterias y hongos que normalmente habitan el tracto anterior y esto puede causar confusión al hacer la interpretación clínica. Cuando se sospecha de en-

fermedades virales que afectan el tracto respiratorio anterior se puede realizar un hisopado nasal y trasladarlo en medios de transporte viral. Los aspirados traqueobronquiales o lavados bronquiales pueden ser una buena alternativa, cuando hay afecciones a nivel pulmonar. Sin embargo, estos son métodos invasivos usados más comúnmente en la clínica de equinos y animales de compañía.

La necrobacilosis laríngea es causada por la bacteria anaeróbica *Fusobacterium necrophorum*, comúnmente asociada con *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*. Para su diagnóstico, no se recomiendan los hisopados, debido al riesgo de exponer la bacteria a oxígeno y coleccionar flora normal (anaeróbica y aeróbica). Comúnmente, el diagnóstico se basa en la sintomatología y en la inspección visual de la laringe por medio de un espéculo oral, endoscopia o radiografía. Si se realiza una necropsia, los tejidos afectados y material purulento se deben llevar al laboratorio en condiciones anaeróbicas (Cuadro 1). Condiciones similares pueden observarse a causa de la presencia de otras bacterias.

El complejo respiratorio bovino está asociado a causas multifactoriales, incluyendo la combinación de múltiples agentes infecciosos, el compromiso de las defensas inmunológicas del animal y condiciones ambientales. En el Cuadro 3 se describen los agentes infecciosos comúnmente asociados a este complejo. No existen signos patognomónicos que permitan identificar a un solo agente, por lo que el inicio de la toma de decisiones al seleccionar las pruebas diagnósticas se basa más en la historia y epidemiología (Fulton & Confer, 2012). En ocasiones, el clínico solicita al laboratorio la identificación del “agente infeccioso”, lo cual es un desafío para el microbiólogo y se convierte en un problema económico para el propietario de los animales, muchas veces sin llegar a un resultado final satisfactorio.

Cuadro 3

Agentes infecciosos relacionados con enfermedades respiratorias en el bovino

Agentes bacterianos	Agentes virales
Anaeróbicos facultativos	Herpesvirus tipo 1
<i>Pasteurella haemolytica</i>	Herpesvirus tipo 3
<i>Pasteurella multocida</i>	Herpesvirus tipo 4
<i>Haemophilus somnus</i>	Parainfluenza virus tipo 3
<i>Actinomyces pyogenes</i>	Virus de la diarrea viral bovina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Virus sincitial respiratorio bovino
<i>Escherichia coli</i>	Adenovirus
<i>Streptococcus</i> spp	Rhinovirus
<i>Staphylococcus</i> spp	Reovirus
<i>Moraxella</i> spp	Enterovirus
<i>Salmonella</i> spp	Coronavirus
<i>Bacteroides</i> spp	Calcivirus
<i>Peptococcus indolicus</i>	Virus de la Influenza
<i>Fusobacterium</i> spp	<i>Ureaplasma</i> spp
<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Chlamydia</i> spp
<i>Mycoplasma dispar</i>	<i>Mycoplasma mycoides</i>

Además de las pérdidas económicas asociadas al diagnóstico, la mortalidad, gastos asociados a terapia y profilaxis y el pobre rendimiento productivo de los animales empeoran el cuadro. Al igual que en el caso de diarreas, algunos laboratorios ofrecen un panel que incluye pruebas diagnósticas para los patógenos más comunes de la zona. La histopatología es de gran ayuda en casos de enfermedades respiratorias (Fulton & Confer, 2012). El análisis histopatológico puede indicar si las lesiones observadas están más relacionadas a un cuadro viral o bacteriano, lo que podría corroborar los resultados microbiológicos.

ABORTOS

Una reproducción animal eficiente va de la mano con el mantenimiento de una industria ganadera rentable. Un incremento en el número de abortos espontáneos, así como una tormenta de abortos son eventos dramáticos en una explotación ganadera. Cuando ocurren tormentas de abortos o se sospechan de agentes zoonóticos, existe una urgencia en identificar el microorganismo asociado. Sin embargo, una gran cantidad de agentes infecciosos y no infecciosos pueden estar asociados con abortos en rumiantes. Hay circunstancias en las que el evento que desencadena el proceso abortivo ocurre semanas o incluso meses antes de que se produzca el evento. Asimismo, cuando se van a tomar muestras, es común encontrar fetos en estado avanzado de descomposición (autolisados) o expuesto a factores ambientales (contacto con animales, suelo, agua) y la placenta no siempre está disponible (Borel *et al.*, 2014; Wheelhouse & Dagleish, 2014). Todos estos factores hacen que el diagnóstico en el caso de abortos sea complicado, costoso y en algunos casos, frustrantes para el propietario, el veterinario y el profesional del laboratorio. En muchos casos, propietario y veterinario, deben decidir si intentar hacer el diagnóstico será promisorio para encontrar el causal (Borel *et al.*, 2014).

Es definitivo que en el caso de abortos, el muestreo correcto involucre una plena cooperación de todas las partes, incluidos los agricultores y el veterinario. Desde la perspectiva del laboratorio, con los nuevos avances en técnicas diagnósticas, se ofrecen pruebas que pueden ser ejecutadas en menos tiempo con la posibilidad de identificar más patógenos. La histopatología, el cultivo bacteriológico y micológico de rutina, pruebas de inmunofluorescencia, aislamiento viral y técnicas moleculares son las bases fundamentales para iniciar la selección de muestras (Holler, 2012). Al igual de lo que ocurre en los casos de diarrea y enfermedades respiratorias, la mayoría de los laboratorios ofrecen un panel que incluye el diagnóstico de las enfermedades más importantes de la región asociadas a abortos.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que en las explotaciones bien administradas y en algunas regiones la mejora de las estrategias de vacunación ha reducido el impacto de las otrora grandes enfermedades infecciosas reproductivas, tales como IBR, virus de la diarrea viral bovina (BVDV), brucelosis y leptospirosis. Lamentablemente, estas patologías están siendo reemplazadas por un aumento de patógenos oportunistas, que parecen estar surgiendo como patógenos importantes (Borel *et al.*, 2014; Wheelhouse & Dagleish, 2014). En el Cuadro 4 se describen las causas más comunes asociadas con abortos, el tipo de muestra que se debe coleccionar y algunas de las técnicas diagnósticas comúnmente usadas en cada caso.

Cuadro 4
Causas comunes de aborto en bovinos, comentarios y estrategias diagnósticas básicas

Enfermedad	Agente etiológico, comentarios	Diagnóstico
Lengua Azul ^a	Orbivirus, Reoviridae Solo un 5% de los animales infectados muestran signos clínicos. Si los bovinos son infectados durante la gestación: se observan abortos y anomalías congénitas con características macroscópicas y microscópicas específicas	RT-PCR. Serología: ELISA, SNV, Aglutinación indirecta AV
Campilobacteriosis	<i>C. foetus</i> ssp <i>venerealis</i> : infección venérea, toros portadores. Vacas no inmunizadas sufren metritis, salpingitis y muerte embrionaria. <i>C. foetus</i> ssp <i>foetus</i> and <i>C. jejuni</i> a: abortos esporádicos.	Aislamiento del patógeno del contenido abomasal del feto. Cultivo. PCR
Diarrea Viral Bovina ^a	Virus de la Diarrea Viral Bovina tipo 1, 2 (Pestivirus, Togaviridae). Dependiendo del tiempo de gestación: • 50-100 días: muerte fetal, aborto o momificación • 100-150 días: fetos con defectos congénitos Antes de 120 días de preñez, con cepa no citopática: Inmunotolerancia y el becerro está en riesgo padecer la enfermedad mucosal a los 6-24 meses de vida Semen infectado: fallas en la fertilización y vacas repetidoras	Inmunofluorescencia. Aislamiento viral. Detección de antígenos: Elisa o Inmunohistoquímica. Serología. RT-PCR
Brucelosis ^{a, b}	<i>Brucella abortus</i> (<i>B. melitensis</i> y <i>B. suis</i>) En rebaños no vacunados abortos en tormenta. La vaca solo aborta una vez pero permanece infectada y excreta la bacteria en partos subsecuentes.	Serología. Cultivo Microscopía directa. PCR
Chlamydiosis ^b	<i>Chlamydia abortus</i> Aborto esporádico en bovinos. Macroscópicamente se observa placenta edematosa, con signos de inflamación y áreas necróticas cubiertas de material purulento.	Frotis de impresión: tinciones especiales. Histopatología. Aislamiento en cultivo celular. PCR
Fiebre Q ^b	<i>Coxiella burnetii</i> En vacas vacías, la infección es típicamente subclínica con reactivación durante la preñez. Abortos esporádicos, se observa placentitis necrotizante. Mastitis subclínica.	Frotis de impresión: tinciones especiales. PCR
Rinotraqueitis Infecciosa Bovina ^a	Herpesvirus bovino 1 (Varicellovirus; Herpesviridae) Abortos posterior a los 90 días después post infección con o sin signos respiratorios previos. Abortos más comunes entre 4 a 7 meses de preñez. La infertilidad no es una secuela de IBR. No se observan lesiones macroscópicas en feto pero se observan focos de lesiones microscópicas en varios órganos con corpúsculos de inclusión viral.	Tejido fetal: Histopatología, IF, PCR. Hisopado vaginal y prepucial: AV. Serología (no adecuada en zonas endémicas).
Leptospirosis ^b	<i>Leptospira interrogans</i> (varios serovares) Abortos en tormenta con algunos serovares pero esporádicos con otros. Los abortos ocurren entre 6 a 12 semanas después de la infección y es más común a los 7 meses de preñez. Otros signos clínicos incluyen: infertilidad, becerros débiles, y síndrome de agalactia	Tejido fetal: IF, PCR. Pruebas para el rebaño: MAT

Cuadro 4 (Continuación)

Enfermedad	Agente etiológico, comentarios	Diagnóstico
Listeriosis ^{a, b}	<i>Listeria monocytogenes</i> Abortos esporádicos o tarde en la gestación. No hay enfermedad sistémica en la vaca ni tampoco infertilidad. La <i>Listeria</i> es excretada en la leche y en descargas uterinas por varios meses después de la infección. Menores brotes ocurren asociados con la alimentación de animales preñados	Cultivo. PCR. Histopatología
Aborto Micótico	<i>Aspergillus fumigatus</i> o <i>Mortierella wolfii</i> Abortos esporádicos y si se presentan es entre 6 a 9 meses de preñez. Características encontradas: <ul style="list-style-type: none"> • Placenta con apariencia de madera con las carúnculas maternas adheridas a los cotiledones. Signo patognomónico es la presencia de lesiones redondeadas en forma de anillos en el feto • Retención placentaria • <i>M. wolfii</i>: abortos en 5% de los casos seguidos de 48 horas de neumonía per aguda y muerte 	Cotiledones y lesiones fetales Histopatología. Cultivo. PCR
Salmonelosis	<i>Salmonella</i> varios serotipos (específicamente Dublin) Abortos esporádicos y la vaca pudiera o no presentar síntomas de la enfermedad. Abortos en gran número pueden ser vistos en rebaños donde los brotes entéricos han ocurrido.	Feto o placenta: Cultivo. PCR
Otras bacterias	Muchas otras bacterias pueden estar asociadas a abortos esporádicos. <i>Trueperella</i> (<i>Arcanobacterium</i>) <i>pyogenes</i> puede producir abortos en cualquier estado de la gestación. Se puede observar endometritis y placentitis. El feto generalmente estará autolizado, con pericarditis y pleuritis fibrinosa.	Cultivo
Tricomoniasis	<i>Trichomonas foetus</i> Muerte embrionaria (infertilidad), abortos ocasionales y piómetra. Como infección venérea el toro porta el parásito en el prepucio y puede infectar el 90% de las vacas. Los fetos mueren de 50-100 días después de la concepción, seguido con ciclos irregulares de celo. Descargas uterinas usualmente purulentas y contiene un gran número de parásitos. El máximo número se alcanza entre el día 3-7 antes del celo.	Descargas uterinas: Examen microscópico y cultivo (las muestras de deben mantener tibias para que el parásito se mantenga móvil). PCR
Neosporosis	<i>Neospora caninum</i> No se observan lesiones macroscópicas específicas en el feto. Por medio de histopatología pueden observarse focos diseminados de necrosis en el cerebro, músculos esqueléticos, corazón y en la placenta.	Inmunohistoquímica. PCR. Serología

Nota: ^a Indica que la enfermedad es asociada a otros signos clínicos de importancia que no se han incluido en la tabla. ^b Indica que son enfermedades de importancia zoonótica.

Técnicas tradicionales y nuevas tecnologías: aislamiento bacteriano y fúngico

Las técnicas de laboratorio destinadas al aislamiento de bacterias y hongos han sido utilizadas desde el inicio de la microbiología y aún se usan diariamente en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Cuando el microbiólogo recibe tejidos colectados de una necropsia, parte de su superficie es “quemada” para evitar el cultivo de flora contaminante. La flora contaminante proviene de un sobre crecimiento post-mortem de la flora normal y también del ambiente. Esta es la razón por la que se sugiere que las piezas de tejido sean lo suficientemente grandes, para que los mismos puedan ser “quemados” externamente, sin afectar los microorganismos que están en el interior. En algunas ocasiones, se recomienda la inoculación de medios de cultivo en el campo (Griffin, 2012).

Tradicionalmente en el laboratorio las muestras son sembradas en placas de agar sangre y manitol (medio selectivo). Sin embargo, en la actualidad existe una infinita variedad de medios de cultivo selectivos y medios de enriquecimiento; los primeros destinados a aislar un microorganismo en particular y los segundos, usados cuando se sospecha que las bacterias estarán en un número insuficiente para su crecimiento en las placas iniciales (Markey *et al.*, 2013). El microbiólogo debe ser un profesional entrenado para ser capaz de discernir entre el crecimiento de flora normal, contaminante y número de colonias prevalentes en las placas de cultivo. De allí la importancia de enviar al laboratorio, una información completa acerca de la presentación clínica de la enfermedad, el uso de antibióticos, la epidemiología y una lista con el diagnóstico diferencial. A la final, la selección de las bacterias a reportar, así como a las que se les realizará un antibiograma será decisión del veterinario microbiólogo. La selección será acertada, si el microbiólogo está bien entrenado, pero también dependerá de la recolección de la muestra y de la información que se haga llegar al laboratorio.

Nuevas tecnologías han desplazado el uso del cultivo tradicional en algunos casos; la razón principal es el tiempo de obtención de resultados y los costos para el laboratorio. Sin embargo, la necesidad de obtener data semicuantitativa de las bacterias presentes en una placa de agar, la realización de antibiogramas y la búsqueda de microorganismos oportunistas o nuevos, hacen que las técnicas tradicionales se mantengan como parte de la rutina. En los últimos años, una nueva tecnología, MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry), en español: desorción láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo; ha venido ganando espacios en laboratorios de diagnóstico. El fundamento de la MALDI-TOF MS es la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales (Legarraga *et al.*, 2013). Esta tecnología ha revolucionado los laboratorios que se dedican al cultivo de bacterias y hongos, pero también está teniendo un gran impacto en actividades de investigación. Las ventajas fundamentales de la técnica son: identificación de microorganismos en unos pocos minutos a partir de colonias (Markey *et al.*, 2013; Organización Mundial de Sanidad Animal, 2013) y en algunos casos de muestras directas (sangre, orina). Con algunas excepciones, no requiere de una preparación especial de la muestra; aunque el costo inicial es elevado, el uso diario representa un costo mínimo por cada muestra cuando se compara con las pruebas tradicionales de identificación (pruebas bioquímicas). No

se requiere de personal altamente capacitado y el entrenamiento es muy corto (2-4 días), siendo sencilla la implementación en el laboratorio y los resultados confiables.

Las compañías que han desarrollado esta tecnología ofrecen base de datos en las que se abarcan miles de microorganismos, sin embargo, esta es una de sus desventajas; cuando el microorganismo no está en la base de datos, no podrá ser identificado. La otra limitación es que para algunas familias de bacterias (Ej. *Streptococcus* spp) la identificación no es tan confiable. En la actualidad, las empresas que patrocinan el equipo están trabajando en mejorar sus bases de datos. Se espera que en el futuro, esta misma tecnología va a ser usada en el diagnóstico de enfermedades parasitarias y virales (Legarraga *et al.*, 2013).

Técnicas serológicas

Las técnicas serológicas son múltiples y por décadas han tenido un gran impacto, principalmente en el diagnóstico de enfermedades virales, aunque también se usan para otros tipos de patógenos. Las técnicas que se incluyen en este grupo son muy numerosas; sin embargo, todas se basan en la inmunología como principio básico. En la mayoría de los casos, se evalúa la “seroconversión” de los títulos de anticuerpos en suero sanguíneo, lo que significa que se requieren dos muestras con un periodo de tiempo intermedio determinado, para evaluar así la respuesta de anticuerpos específicos en el tiempo. El periodo entre la toma de muestras dependerá del tipo de prueba diagnóstica y del patógeno, sin embargo, en la mayoría de los casos la segunda muestra se toma entre 10 y 25 días después de haber colectado la primera.

Otra generalidad es que los anticuerpos que comúnmente se detectan son IgM e IgG. La detección de IgM está más asociada a una infección muy reciente (enfermedades en fase aguda) y la de IgG indica el estatus inmune de un individuo frente a un antígeno (molécula de un microorganismo) en particular. Incrementos en el tiempo en los títulos de IgG probablemente se asocian a una infección latente, mientras que si los títulos se mantienen o disminuyen en el tiempo se podría pensar en convalecencia, inmunidad pasiva, vacunación o exposición previa al patógeno. Finalmente, se debe tener en cuenta que mediante técnicas serológicas se detectan respuestas vacunales e infecciones pasadas, lo que no necesariamente representa resistencia al patógeno.

La técnica de seroneutralización viral (SNV) consiste en la neutralización de una cantidad conocida de virus por medio de los anticuerpos del suero: el título será el inverso al de la dilución más alta en el que se alcance la neutralización viral. Esta técnica puede ser de gran ayuda (alta especificidad y sensibilidad), porque se mide la cantidad de anticuerpos capaces de neutralizar al patógeno. Sin embargo, puede ser costosa y exige de tiempo al personal del laboratorio. La prueba ELISA (en español: Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas), es una técnica en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o algún otro tipo. A diferencia de la SNV, por medio del ELISA solo se miden los anticuerpos capaces de unirse al patógeno. Existen muchas variantes de la técnica que son amplias y no pueden ser descritas en este capítulo debido a restricciones de espacio; sin embargo, se debe mencionar que algunos tipos están diseñados para la detección directa de antígenos (agente infeccioso). La técnica es muy popular en los laboratorios de diagnóstico, es fácil de rea-

lizar, económica y cuenta con una alta especificidad y sensibilidad. En la actualidad, existen en el mercado una gran disponibilidad de kits comerciales que pueden ser usados a campo y en clínicas veterinarias.

Las pruebas de inmunofluorescencia, directa (IF) e indirecta (IFI) son también comúnmente usadas. Son pruebas que ofrecen un diagnóstico rápido y son fáciles de realizar. Se usan para enfermedades virales, bacterianas y fúngicas. Un ejemplo común es la detección de *Clostridium* histotóxicos. Estos microorganismos son muy difíciles de cultivar en el laboratorio por su poca tolerancia al oxígeno, mientras que la muestra se recolecta y se transporta al laboratorio. Existen muchas otras pruebas serológicas, tales como la fijación del complemento, inmunoabsorción, hemaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación (Markey *et al.*, 2013). Sin embargo, las pruebas de IF, IFI, SNV y ELISA son las más usadas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas del bovino.

Técnicas moleculares

Aproximadamente tres décadas atrás, la implementación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) trajo consigo una revolución a los laboratorios de diagnóstico. Tener la posibilidad de identificar microorganismos de cualquier clase a partir de tejidos descompuestos, congelados, cortes histológicos y con la mínima cantidad de muestra, ofreció un nuevo abanico de posibilidades para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. En sus inicios, con el PCR de tipo convencional, el proceso para obtener un resultado podía durar entre dos a tres días. Actualmente, con las mejoras en las técnicas de extracción de ácidos nucleicos y el desarrollo del PCR en tiempo real, un resultado se puede obtener en 2 a 3 horas. En otro sentido, con la puesta en marcha del PCR, también se originó que los laboratorios se enfocaran en técnicas de secuenciación para la identificación de nuevos patógenos, lo que anteriormente era ejecutado principalmente por laboratorios de investigación.

En la actualidad, muchos laboratorios de diagnóstico usan multiplex PCR, con lo que a partir de una sola muestra se logran identificar cierta cantidad de patógenos con una sola prueba. Cada laboratorio decide cuales patógenos incluirá dependiendo de las enfermedades más comunes de la zona o de la especie animal. Un ejemplo del uso de un multiplex PCR es la identificación de 3 a 4 microorganismos asociados a diarreas bacterianas en becerros con un test único. Las ventajas del PCR son muchas y aunque en sus inicios se consideraba una técnica sumamente costosa, en la actualidad con la automatización y la globalización de la técnica el costo de los equipos y los costos de insumos por muestras han disminuido de forma notable.

Sin embargo, se deben considerar algunas de las desventajas. La detección de microorganismos no viables (muertos) podría ser un grave problema en ciertos casos. Si un animal ha sido sometido a terapia antimicrobiana, es posible que al momento de recolectar la muestra, aún se encuentre el microorganismo en la misma, aunque muerto por el efecto de la droga. Si en este caso se realiza un cultivo bacteriano, el microorganismo no crecerá, pero si se realiza un PCR, el resultado muy probablemente será positivo. En estas situaciones, el PCR sería un factor de confusión en la resolución de este caso. También se debe considerar que cuando se realiza el cultivo bacteriano, el veterinario microbiólogo puede inferir a partir del crecimiento en una placa,

cual microorganismo es prevalente en la misma y reportarlo de esta manera al clínico, con el PCR esta posibilidad está limitada.

Otra desventaja es que se debe tener un blanco determinado; la técnica depende de cebadores que se diseñan de forma específica para un microorganismo. Cuando se realiza aislamiento viral o cultivo bacteriano existe la posibilidad de encontrar patógenos oportunistas o desconocidos, lo que generalmente no puede realizarse con un PCR específico. Sin embargo, estos hallazgos (oportunistas o nuevos patógenos) deben enviarse al laboratorio de diagnóstico molecular, donde usando primers universales, pueden ser secuenciados e identificados.

Antes del advenimiento del PCR, algunos laboratorios de diagnóstico usaban hibridación por sondas. Las sondas son segmentos de ADN o ARN que han sido marcados con enzimas, sustratos antigénicos, quimioluminiscencia o radioisótopos. Estas sondas se pueden unir con una alta especificidad a una secuencia complementaria de ácido nucleico en una muestra (Ej. tejidos). Las sondas de oligonucleótidos tienen la ventaja de hibridar más rápidamente a las moléculas blanco y pueden, bajo ciertas condiciones, detectar el cambio de un nucleótido dentro de una secuencia de ácido nucleico. Esta técnica no tiene una alta sensibilidad y ha venido a ser reemplazada por el PCR y últimamente por el chip de ácidos nucleicos (microarray).

En palabras simples, un microarray es una colección de partículas microscópicas (generalmente ADN) que puede ser hibridada con moléculas blanco, efectoras, para producir bien sea, una data cuantitativa (expresión genética) o una data cualitativa (información diagnóstica). La principal ventaja de los microarrays es la multiplexación, lo que permite la exploración de la microbiota y la detección de múltiples patógenos en casos de bacteriemia, enfermedades respiratorias, abortos e infecciones digestivas (Markey *et al.*, 2013). Es una técnica costosa que aún no se ha implementado en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico; sin embargo, muchos científicos predicen que el uso de microarrays será de uso rutinario en el futuro, como el próximo escalón del laboratorio de diagnóstico molecular.

CONCLUSIONES

El desarrollo de nuevas tecnologías ha originado que el diagnóstico de enfermedades infecciosas haya avanzado de forma fascinante en las últimas décadas. En sus inicios, técnicas tales como secuenciación genética, espectrometría de masas y microarray se restringían a laboratorios de investigación. En la actualidad, algunas de estas están disponibles a nivel mundial en laboratorios veterinarios. Sin embargo, se debe tener en cuenta que técnicas tradicionales, como el cultivo y aislamiento de microorganismos en placas de cultivo, siguen siendo de uso diario en los mismos laboratorios. La técnica de PCR podría ser considerada como la más popular en estos tiempos, no obstante deben entenderse sus ventajas y limitaciones.

En todo caso, es responsabilidad del médico veterinario y del veterinario microbiólogo establecer una estrategia para la toma de muestras, como para la selección de las pruebas a realizar y su correcta interpretación. La búsqueda de un diagnóstico definitivo con frecuencia conlleva a la ejecución de más de una prueba diagnóstica. La evaluación macroscópica y microscópica (histopatología), junto con la sintomatología

clínica, son las claves para realizar una correcta interpretación de los resultados de las pruebas de laboratorio. Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia del agente causal en el rebaño o que está asociado a la enfermedad. Es imperativo mencionar que muchas de las enfermedades que se diagnostican a diario pueden ser zoonóticas o de declaración obligatoria al Estado. Si la estrategia de diagnóstico ha sido bien diseñada, a la larga, se logrará la prevención de enfermedades que afecten la productividad y la rentabilidad de los rebaños y/o la salud pública.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borel N, Frey C, Gottstein B, Hilbe M, Pospischil A, Franzoso F, Waldvogel A. 2014. Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. *Vet J.* 200: 218-229.
- Fulton RW, Confer AW. 2012. Laboratory test descriptions for bovine respiratory disease diagnosis and their strengths and weaknesses: Gold standards for diagnosis, do they exist? *Can Vet J* 53: 754-761.
- Griffin D. 2012. Field Necropsy of Cattle and Diagnostic Sample Submission. *Vet Clin Food Anim* 28: 391-405.
- Holler LD. 2012. Ruminant Abortion Diagnostics. *Vet Clin Food Anim* 28: 407-418.
- Hodgson J, Hughes K, Hodgson D. 2008. Diagnosis of bacterial infections. Part 1. Principles of sample collection and transportation. *Equine Vet Educ* 20 (11): 608-616.
- Legarraga P, Moraga M, Lam M, Geoffroy E, Zumarán C, García P. 2013. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Rev Chilena Infectol* 30 (2): 140-146.
- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*. 2nd Edition. ELSEVIER.
- OIE. 2013. Organización Mundial de Sanidad Animal. Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico. En: *OIE Terrestrial Manual (Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE)*. 10 pp.
- Wheelhouse N, Dagleish M. 2014. Diagnosing the causes of ruminant abortion: Where are we now? *Vet J.* (In press)