

Toma y remisión de muestras al laboratorio para diagnóstico de problemas sanitarios

Resumen de la conferencia dictada por el **MV. Gabriel Di Cola**, Laboratorio de Salud Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto, en el ámbito de las XXXII Jornadas de Actualización en Ciencias Veterinarias (Octubre de 2013)

¿Qué es el Diagnóstico?

Realizar un diagnóstico es sumar información de distintos tipos sobre un problema sanitario, para luego analizarlos, demostrando la relación causal entre uno o varios agentes etiológicos y la enfermedad. Para esto, deben aplicarse distintas metodologías diagnósticas que no son excluyentes sino complementarias.

Para arribar a un **DIAGNÓSTICO DE CERTEZA**, el mismo solo puede ser estructurado sobre el análisis de toda la información obtenida. De esta manera, será posible llegar al mismo si se parte de la base de tres tipos de diagnósticos:

- 1) Diagnóstico epidemiológico**
- 2) Diagnóstico anatomopatológico**
- 3) Diagnóstico etiológico o de laboratorio**

Para arribar al **diagnóstico epidemiológico**, siempre es necesario analizar la **TRÍADA ECOLÓGICA**. La anamnesis (sobre ambiente, nutrición y manejo) es el pilar fundamental de un diagnóstico clínico “presuntivo” y junto a la sintomatología y a las lesiones anatomopatológicas de los individuos afectados, constituye una herramienta indispensable para caracterizar una patología en el marco de un sistema productivo. De esta manera, mediante los datos obtenidos durante la anamnesis, el veterinario sanitarista podrá inferir por ejemplo, la posible etiología de un brote de abortos, relacionando el tercio de gestación en el cual ocurre con la presentación de “tormentas” o abortos en “goteo”.

El **diagnóstico anatomopatológico** es una herramienta útil para caracterizar a través de la observación de lesiones “patogénicas” o compatibles con una patología, la posible causa de

muerte de un animal. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el diagnóstico sólo puede darse como “compatible” con distintas enfermedades, sin que pueda definirse con exactitud la verdadera etiología desencadenante.

El **diagnóstico de laboratorio** si bien es el de mayor rigor científico, ya que permite detectar en forma **directa** o **indirecta** (mediante análisis serológico) el agente causal, tiene la limitación de que sólo puede ser interpretado en conjunto con los diagnósticos anteriores, ya que la sola presencia de un microorganismo aislado del individuo enfermo, no es confirmatoria de la patología sospechada (ej. Aislamiento de *E. coli* a partir de materia fecal).

El diagnóstico puede ser individual (un solo individuo enfermo) o poblacional (cuando son varios los afectados).

Demostración del agente:

Al agente etiológico se lo puede aislar, demostrar su presencia o detectar su paso por el huésped. Para el diagnóstico directo se emplean distintas técnicas en función del tipo de agente etiológico actuante

(Tabla 1)

Técnicas utilizadas en el diagnóstico directo

	Siembra en medios de cultivos	Inoculación en huevos embrionados	Inoculación en cultivos de tejidos	Fijación de Complemento ¹	I F	PCR	ELISA
Virus	-	+2	+2	+	+	+	+
Rickettsias	-	+	+	-	+	+	-
Mycoplasmas	+	+	+	-	+	+	+
Bacterias	+	-	-	-	+	+	+
Hongos	+	-	-	-	-	+	-

1 utilizando sueros de referencia

2 dependiendo de las características propias del virus

En el diagnóstico indirecto se emplean distintas técnicas en función de las características del agente etiológico (Tabla 2)

Tabla 2

Técnicas utilizadas en el diagnóstico indirecto

	ELISA	IHA	SN	F.C1	H	IF	ID	TL	PCR
Virus	-	+	+2	+2	-	+	+	+	+
Rickettsias	-	-	+	+	-	+	-	-	+
Mycoplasmas	+	-	+	+	-	+	-	-	+
Bacterias	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Hongos	+	-	-	-	+	-	-	-	+

ELISA: enzimo-inmuno-ensayo IHA: inhibición de la hemaglutinación
 SN: seroneutralización FC: fijación de complemento
 H: hipersensibilidad IF: Inmunofluorescencia
 ID: Inmunodifusión TL: Test de Látex
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Tipo de muestra, acondicionamiento y envío:

- Criterio de selección de las muestras:

El sentido común es muy importante para aplicar criterios en la selección de las muestras. Para aplicar un buen criterio es necesario haber sumado la máxima cantidad de información sobre el ambiente, la nutrición, el manejo, los síntomas y las lesiones anatomopatológicas observadas en eventuales necropsias.

En primera instancia se debe coleccionar materiales lo más frescos posibles. Un cadáver con varias horas de muerto generalmente en estado de putrefacción, por lo que muchos agentes pueden enmascarse por contaminaciones post-mortem. La velocidad de la putrefacción depende de la temperatura ambiente, de la alimentación que están consumiendo y del tipo de agente que causó la muerte. Así por ejemplo, en invierno los cadáveres se conservan por más horas; cuando los animales están consumiendo alimentos de rápida fermentación ruminal como la alfalfa o ración, la temperatura que infunde el rumen descompone rápidamente los órganos cercanos; cuando la causa de la muerte la producen *clostridium* gas-gangrenosos la putrefacción es muy rápida.

Es necesario enviar los órganos relacionados con el patrón sintomático predominante. Según el problema de que se trate también se debe enviar suero de animales enfermos, convalecientes y sanos (ver tipo de muestreo serológico dirigido)

- **Requisitos mínimos para enviar las muestras al Laboratorio:**

Cada vez que se envía un material debe adjuntarse la anamnesis más completa posible. Los distintos órganos deben colocarse de manera individual en recipientes estériles o en bolsitas de nylon. De preferencia enviar las partes de los órganos con lesiones. Aquellos órganos difíciles de diferenciar deben estar bien identificados (por ejemplo identificar los ganglios enviados, la porción de intestino enviada, etc.).

Si se decide realizar un estudio histopatológico, lo ideal es coleccionar las muestras del tamaño de un dado en formol bufferado al 10% (los órganos no deben superar el 10% de la cantidad de fijador empleado).

Las muestras deben acondicionarse en cajas de telgopor limpias y sanas del tamaño necesario según el volumen de muestras enviadas. Agregar los conservantes congelados suficientes para que conserven una temperatura de 2-8°C hasta su llegada al laboratorio.

Las conservadoras deben llevar un rótulo indicando el destinatario, dirección y teléfono bien claro. Por otro lado, es necesario indicar que se trata de material biológico perecedero de entrega inmediata. Toda nota que se incluya en la conservadora debe estar envuelta en bolsa de nylon.

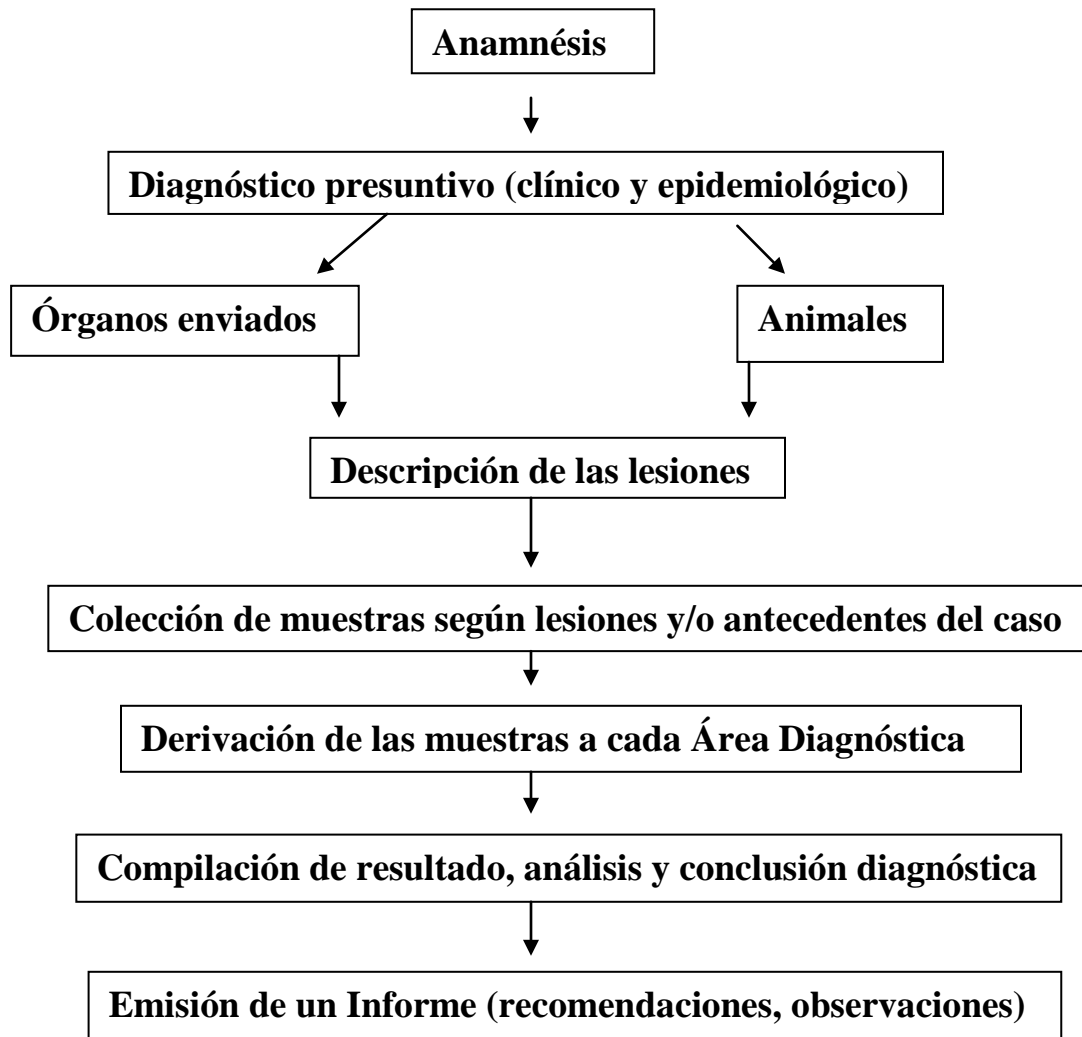
***ES MÁS IMPORTANTE ASEGURAR UNA BUENA MUESTRA QUE TODA LA
TECNOLOGÍA DEL LABORATORIO***

Elementos necesarios para coleccionar diferentes muestras y enviarlas a un Laboratorio de Diagnóstico.

Los Veterinarios Sanitaristas siempre deberían llevar consigo un equipo mínimo para coleccionar diferentes tipos de muestras, según el problema sanitario que se aborde.

- Tubos de vidrio estériles tapa a rosca o de sangrado con tapón de goma, Tubos para sangrado limpios (de vidrio o descartables de PMMA) y gradilla/s
- Tubos químicamente limpios y secos con tapón de goma (utilizados para perfil mineral y perfil metabólico)
- Anticoagulante (EDTA) para hematología. Hisopos estériles comunes (secos) y con medio de transporte para aislamiento de microorganismos fastidiosos.
- Recipientes de plástico estériles de diferentes tamaños (capacidad desde 50 cm³ a 200 cm³.)
- Jeringas y agujas estériles de diferentes tamaños.
- Pipetas de inseminación artificial estériles (las comunes de plástico duro y las vainas azules descartables de Cassou para pipeta universal), Pipeta universal (para vainas azules) y/o jeringas con intermediario de goma entre esta y la pipeta de IA común.
- Caja de telgopor limpia y sana, con conservantes limpios.
- Cinta de empaquetar, Cinta de enmascarar, Portaobjetos (para realizar frotis)
- Formol bufferado al 10% en recipientes de boca ancha y cierre hermético (para coleccionar muestras para análisis histopatológico)

FLUJOGRAMA DEL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO



PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO

El objetivo de la necropsia es observar las alteraciones macroscópicas y obtener muestras para efectuar pruebas microbiológicas, serológicas, histopatológicas o de inoculación en animales.

Con procedimientos metódicos es menos frecuente ignorar posibles lesiones y no se contaminaran las muestras extraídas. Siempre es más conveniente extraer muestras de más y no omitir ninguna. Es mejor conservar los tejidos y luego desecharlos si no se utilizan.

Una guía para un buen diagnóstico es el arte de observar tanto el bosque como los árboles. En todas las oportunidades se debe tratar de identificar los problemas más significativos de la población a través de los patrones patológicos.

Anamnesis:

Es importante visitar el establecimiento con problemas. Mientras mayor información obtenga el Veterinario acerca de la historia y el medio ambiente, más fácil le será llegar al diagnóstico.

El conocimiento de factores de manejo, alimentación, ofrecimiento de agua, medicaciones, vacunaciones, evolución del desarrollo o parámetros productivos (ganancia diaria de peso) etc. También es importante considerar la ubicación de la granja, fenómenos climáticos poco frecuentes. Debe registrarse la observación de signos clínicos realizado por los operarios y la tasa de morbilidad y mortalidad.

Examen externo:

Se debe realizar una observación detallada de los signos clínicos. La conducta general de la población (animales con incoordinación, temblores, marcha anormal, ceguera, dificultad respiratoria, depresión, diarrea, otros)

En el examen deben observarse tumores, abscesos, cambios de piel, exudados nasales, exudados conjuntivales, estado general de los animales, deshidratación, etc.. Todos estos datos son pistas útiles.

Toma de muestras:

Las muestras de órganos y/o exudados deben colectarse de animales sacrificados o de pocas horas de muertos. Las muestras deben colectarse antes de extraer y observar los órganos de la carcasa y de ser posible utilizar pinzas y tijeras estériles (con mechero o esterilizados en olla a presión)

Es conveniente coleccionar muestras de órganos o exudados en recipientes estériles individuales. Estas muestras deben refrigerarse y mantener la cadena de frío hasta que lleguen al laboratorio.

Cuando se extraen muestras para análisis histopatológicos es importante no mezclar órganos de distintos animales. Las muestras se colocan en una solución formalina al 10%. El tamaño de la muestra a fijarse no debe superar 1 cc, donde haya tejido sano y tejido alterado, para comparar la arquitectura normal del tejido con la alterada.

ANÁLISIS EN EL LABORATORIO

Monitoreo Serológico:

Los problemas por enfermedades actuales a menudo representan la suma de varios trastornos subclínicos que suceden en diferentes momentos a lo largo de la vida de una cohorte.

Adquirir un conocimiento completo de cuál es la dinámica de los anticuerpos contra diferentes enfermedades en una población, es de suma importancia para la prevención sanitaria. A modo de presentación gráfica y sistemática se denomina “perfil serológico de una cohorte”. El establecer tales perfiles se facilita mediante la tecnología de ELISA. Se puede monitorear una sola enfermedad o usar un sistema para vigilar un amplio rango de enfermedades.

Se ha demostrado el valor de correlacionar los datos del perfil serológico con el rendimiento productivo del lote. Por otro lado, si a estos resultados le sumamos datos anatomopatológico macro y microscópicos, obtenemos una radiografía sanitaria muy completa para una enfermedad en una determinada población.

Este diagnóstico tiene una amplia aplicabilidad en investigaciones epidemiológicas, investigaciones de campo, comportamiento de vacunaciones (protección), indicador de aplicación de medidas sanitarias adecuadas y oportunas.

Pueden establecerse los perfiles de base, tanto como objetivos para vacunación, así como una base a partir de la cual pueden demostrarse desviaciones de lo normal cuando se encuentra algún problema de campo de manera subsecuente.

En la actualidad los laboratorios ofrecen varios equipos para perfiles para estudiar enfermedades.

El valor de estos monitoreos aumenta cuando se combinan buenos datos representados gráficamente con habilidad y experiencia del Veterinario para analizar toda la información y lograr máxima salud y producción.

Bacterioscopía:

Con frecuencia en el laboratorio se preparan frotis con exudados y órganos afectados para realizar una observación rápida mediante diferentes colocaciones. Las coloraciones más frecuentes son la técnica de Gram, de Giensa y Zhiel Neelsen.

Diagnóstico Bacteriológico:

De rutina los órganos y/o exudados se siembran en Agar Sangre (en aerobiosis y en microaerofilia) y Mc Conkey (medio selectivo para Enterobacterias)

Generalmente se analizan órganos como el hígado el pulmón y ganglios. Cuando se estudian problemas respiratorios también se suele analizar el exudado nasal o de senos y/o abscesos.

En ocasiones se solicitan análisis bacteriológicos especiales para lo cual se deben emplear medios y condiciones de cultivo especiales. Estos pedidos son frecuentes para investigación de *Salmonella*, *Haemophylus*, *Mycoplasma*.

Diagnóstico Viroológico:

Para el diagnóstico viral de rutina se preparan suspensiones centrifugadas o filtradas de los tejidos sospechosos (generalmente se trabaja con alguno o varios de estos órganos: tráquea, bronquios, pulmón, hígado, brazo, riñón, cerebro y médula ósea; exudados corporales). Estas suspensiones o filtrados se inoculan en cultivos de células para aislamiento.

Los cultivos de células pueden ser: cultivos primarios o líneas celulares. Es importante mencionar como técnica rápida para el diagnóstico virológico los test de inmunofluorecencia directa o indirecta (IF)

Diagnóstico Serológico:

Si bien son muchas las técnicas serológicas empleadas para el diagnóstico de las diferentes enfermedades que afectan a las aves se puede decir que las técnicas más utilizadas son las de ELISA. Con menor frecuencia se utilizan técnicas de Inhibición de la Hemoaglutinación, de Aglutinación en Placa y de Inmunodifusión.

Diagnóstico Parasitológico:

Se utiliza con frecuencia la técnica de Flotación Simple para determinar la presencia de huevos de parásitos gastrointestinales y el conteo de huevos (HPG) o flotación con azúcar para investigar Coccidiosis.

MATERIALES A REMITIR EN LOS DIFERENTES SINDROMES

Síndrome nervioso:

Material a enviar: SNC estéril. En su defecto remitir la cabeza entera. LCR.

Suero, sangre entera.

Diagnósticos: IBR (cuadro encefálico), PEM, Listeria monocitógenes.

Cuadro ocular:

Material a enviar: Hisopados oculares

Diagnósticos a descartar: IBR (cuadro ocular) Moraxella Boris, Bramerella

Complejo respiratorio:

Material a enviar: Pulmones o muestra de pulmones.

Suero y sangre entera

Diagnósticos: IBR (cuadro respiratorio), PI 3, VSRB, Pasteurella, haemophylus somnus.

Complejo digestivo

Material a enviar: Tubo digestivo ligado con linfonódulos adyacentes; hígado, materia fecal (dependiendo de la edad de los animales)

Diagnósticos: Bacterianas, Virales y Parasitarias.

Complejo reproductivo:

Aborto: remitir aborto completo o en su defecto: pulmones, hígado, bazo, riñones, líquido de abomaso y colectas en jeringas estériles.

Vaca vacía: Mucus cervicovaginal, placenta (¿?), Sueros pareados.

Diagnósticos: Bacterianas, Virales y Parasitarias.