

DETERMINACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DEL PERFIL REPRODUCTIVO EN BOVINOS: REVISIÓN

Determination of the methods of diagnostic of the reproductive profile in cattle: review

Ordóñez-Andrade G¹

¹Universidad Estatal de Bolívar. Guamujo 92. Guaranda, Ecuador. gabyvordo@yahoo.es

RESUMEN

Las patologías que se busca erradicar en un control reproductivo son enfermedades de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. Son responsables de ocasionar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones, siendo los trastornos reproductivos los de mayor impacto económico. Las estrategias de identificación y de erradicación de patologías dependen de la situación epidemiológica regional; básicamente consisten en la identificación y eliminación de bovinos infectados, principal fuente de infección y reservorio de estas enfermedades. La determinación de que o cuales enfermedades se deben controlar dependerá de la situación en la que se encuentre el país o el lugar de asentamiento animal, por lo cual no se puede establecer un perfil reproductivo estándar. El perfil reproductivo y su control dependerá de las necesidades del hato en sí. El objetivo de esta investigación bibliográfica es aportar datos actualizados sobre distintos métodos de diagnóstico en perfil reproductivo para bovinos lo cual también estará sujeto a la facilidad y acceso que tenga el Médico Veterinario a las técnicas descritas para identificación de las patologías.

Palabras clave: Diagnóstico, métodos, perfil reproductivo, bovinos.

ABSTRACT

The pathologies that are sought to eradicate in a reproductive control are diseases of worldwide distribution and endemic in the majority of the bovine populations. They are responsible for causing a wide range of clinical manifestations and injuries, with reproductive disorders having the greatest economic impact. Strategies for identifying and eradicating pathologies depend on the regional epidemiological situation; basically, consist of the identification and elimination of infected cattle, the main source of infection and reservoir of these diseases. The determination that or which diseases should be controlled will depend on the situation in which the country or the place of animal settlement is located, for which reason a standard reproductive profile can't be established. The reproductive profile and its

control will depend on the needs of the herd itself. The objective of this bibliographical research is to provide an updated data on different methods of diagnosis in the bovine reproductive profile, which will also be subject to the ease and access that the Veterinarian has to the techniques described to identify the pathologies.

Keywords: Diagnostic, methods, reproductive profile, cattle.

INTRODUCCIÓN

Este estudio bibliográfico se realizó con el fin de implementar una guía para el veterinario o profesionales a fin al estudio o erradicación de las patologías enmarcadas en un perfil reproductivo. Las enfermedades no se las puede definir epidemiológicamente ya que no se encuentra un estudio establecido de cuáles son las enfermedades a diagnosticar en un control reproductivo debido a que las enfermedades no son solamente endémicas y su probabilidad de ocurrencia no se puede detectar por los cambios y mutaciones en su estructura genómica.

Adicionalmente estas patologías causan un daño económico enorme y la mayoría de ellas se traducen a la aparición de abortos que es un factor limitante del desarrollo ganadero en todos los países del mundo y no resulta ser un síntoma patognomónico de estas, con lo cual es difícil diagnosticar sin haber realizado un diagnóstico de laboratorio como herramienta fundamental para su control y erradicación. El aborto bovino puede presentarse en forma esporádica o endémica o en forma de brote y pueden ser de origen infeccioso y no infeccioso por lo que establecer el agente causal es difícil. Los agentes infecciosos con o sin tropismo por las membranas fetales y/o fetos son la Brucella, Leptospira, diarrea viral bovina, Aspergillus sp., Neospora caninum, etc., y pueden ocasionar en el embrión o feto un conjunto de fetopatías dependiendo del periodo de la gestación y de la virulencia del agente infeccioso (Rivera, 2001)

REVISION

Enfermedades que constan en un perfil reproductivo

Las enfermedades que constan en un perfil reproductivo son Brucella, Leptospira, Diarrea Viral Bovina, Neospora caninum, Leucosis Bovina y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina.

Brucella

La brucelosis es una enfermedad endémica en muchos países. Afecta la sanidad y la producción, además tiene una importante repercusión económica en el comercio internacional de animales y productos derivados. Ocasiona significativas pérdidas en la producción pecuaria debido no solamente a la enfermedad en sí, sino es la generación de anticuerpos en las hembras vacunadas y que interfieren con las pruebas diagnósticas más utilizadas que emplean antígenos con lipopolisacáridos (LPS) lisos. Estos LPS lisos están presentes tanto en la cepa utilizada en la vacunación como en las cepas de campo, lo que indica que son similares de forma antigénica, además de que explica la similitud de la respuesta inmune que existe entre un animal vacunado y uno infectado (Martínez-Herrera, 2011)

El manual de bioseguridad para laboratorios elaborado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los microorganismos del género *Brucella* en el Grupo de Riesgo III. La brucelosis se transmite fácilmente al hombre y causa una enfermedad febril aguda –la fiebre ondulante- que puede convertirse en crónica y producir complicaciones graves que afectan a los músculos esqueléticos, al sistema cardiovascular y al sistema nervioso central. A menudo la infección se debe a una exposición profesional y se adquiere por vía oral, respiratoria o conjuntival, pero el riesgo mayor para la población general es la ingestión de productos lácteos contaminados.

Los veterinarios y granjeros que manejan animales infectados, fetos abortados o placentas, están expuestos a riesgo laboral. La brucelosis es una de las enfermedades de más fácil adquisición en el laboratorio, y se deben observar precauciones de seguridad muy estrictas cuando se manejen cultivos y muestras infectadas, como los productos del aborto. (OIE, 2004).

Todos los abortos en el ganado bovino deben considerarse como casos sospechosos de brucelosis y deberían investigarse. El cuadro clínico no es patognomónico, aunque la historia del rebaño puede servir de ayuda. El diagnóstico inequívoco de infecciones por *Brucella* solo puede hacerse por aislamiento e identificación de *Brucella*, pero en situaciones en las que no es posible el análisis bacteriológico, el diagnóstico puede basarse en métodos serológicos. No existe una prueba única que permita la identificación de *Brucella*. Normalmente se necesita una combinación de las características de crecimiento y métodos serológicos y bacteriológicos. (OIE, 2004)

Tabla 1. métodos directos para diagnóstico de brucella.

Método Diagnóstico bacteriano	
Técnica	Aislamiento bacteriano
Veracidad	Gold estándar. Específico permite biotipificar el microorganismo (Bricker, 2002) (Al Dahouk, 2003)
Tipo de muestra	Membranas fetales (cotiledones). Órganos fetales (pulmón, linfonódulos bronquiales, bazo, hígado, secreciones vaginales (hasta seis semanas después del aborto), semen y leche de los 4 cuartos (Lage, 2008)
Dificultad	Requiere alta especificidad en los medios de cultivo. Necesita alto número de muestras viables, almacenamiento adecuado y rápida entrega al laboratorio de diagnóstico. Fácil contaminación. Laboratorio específico nivel 3 y personal capacitado Se necesita cultivos enriquecidos con antibióticos (De Miguel, 2011)
Método Inmunohistoquímica	
Técnica	Estudios patogénesis /lesiones
Veracidad	Poca veracidad
Tipo de muestra	Dependiendo de las lesiones (Xavier, 2009)
Dificultad	No requiere una bacteria viable (Santos, 1998) Protocolos de fijación y selección del anticuerpo primario (Ramos-Vara, 2005)
Métodos moleculares para genotipar las especies de Brucella	
Técnica	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Amplificación de una secuencia genómica del gen, especie o biotipo de Brucella
Veracidad	Es el más usado para el diagnóstico definitivo (Bricker, 2002) Su rango de sensibilidad va del 50 -100% y una especificidad entre el 60 y 98% (Mitka, 2007)
Tipo de muestra	Muestra clínica
Dificultad	Requiere un laboratorio de seguridad nivel 3 (Boschioli, 2001)
Técnica	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex Identifica el género en el nivel de especie y en parte al nivel de biovar con diferentes combinaciones
Veracidad	Este método podría identificar tres biovares (1, 2 y 4) de <i>B. abortus</i> , Todos los biovares de <i>B. melitensis</i> , todos los biovares de <i>B. ovis</i> y biovar 1 de <i>B. Suis</i> . Un ensayo AMOS PCR de multiplexación abreviada basado en tres. Se desarrollaron cebadores adicionales para diferenciar la vacuna de <i>B. abortus</i> Cepas S19 y RB51 de las cepas de campo (Ewalt, 2000)
Tipo de muestra	Requiere un laboratorio de seguridad nivel 3 (Boschioli, 2001)
Dificultad	El protocolo de extracción de ADN, tipo de muestra clínica y la detección de los límites para cada protocolo son factores que influyen en la eficiencia de la técnica (Mitka, 2007)
Técnica	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real
Veracidad	La PCR en tiempo real es más rápida y más sensible que la PCR convencional. Y se añade un cebador específico a las ocho mezclas de cebadores de AMOS PCR, permitiendo potenciar el poder de discriminación de este ensayo
Tipo de muestra	Los ensayos de PCR en tiempo real se han descrito recientemente con el fin de probar células de Brucella (Redkar, 2001) orina (Queipo-Ortuño, 2005) sangre y parafina en Tejidos (Redkar, 2001)
Dificultad	Requiere un laboratorio de seguridad nivel 3 (Boschioli, 2001)
Tipos de polimorfismos	de nucleótido único.
Técnica	Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) representan marcadores que permiten describir con precisión el marco filogenético basado en una serie de ensayos de discriminación de una especie, particularmente en un grupo genéticamente conservado como Brucella.

Veracidad	El ensayo distingue a todos los miembros de la especie clásica, pero la diferenciación de <i>B. suis</i> y <i>B. canis</i> fue difícil, ya que no hay <i>B. suis</i> específico. El SNP ha sido identificado. Sin embargo, como un SNP específico de <i>B. canis</i> ha sido Identificado, es posible una discriminación con <i>B. suis</i> / <i>B.</i> del perro SNP específicos y el <i>B. canis</i> SNP específicos (Whatmore, 2007)
Tipo de muestra	Muestras clínicas
Dificultad	Requiere un laboratorio de seguridad nivel 3 (Boschioli, 2001). El protocolo de extracción de ADN, tipo de muestra clínica y la detección de los límites para cada protocolo son factores que influyen en la eficiencia de la técnica (Mitka, 2007)

Tabla 2. Métodos indirectos para diagnóstico de brucella

Standard slow agglutination 40uve test (SAT)	
Que identifica	Aglutinación del antígeno bacteriano (IgM)
Veracidad	Especificidad baja no se recomienda (Nielsen, 2004) (OIE, 2004)
Tipo de muestra	Sangre
Interferencias/ observaciones	Los resultados señalaron que los animales vacunados con campilobacteriosis arrojaron resultados falsos positivos a las técnicas del BPA y SAT, desde los 15 hasta los 45 días post-vacunación. (Jacobo, 2002)
Test Anillo de leche	
Que identifica	Aglutinación de anticuerpos secretados en leche
Veracidad	El resultado indica la presencia de ganado infectado en el rebaño, por lo que la prueba debe ser seguida por la prueba serológica individual en el rebaño entero. (OIE, 2009)
Tipo de muestra	Leche del rebaño
Interferencias/ observaciones	De una población no se puede identificar al animal positivo
2 – mercaptoetanol	
Que identifica	Prueba de confirmación que permite la Cuantificación de IgG anti-Brucella debido a la inactivación de IgM en la muestra de prueba.
Veracidad	El 2-mercaptoetanol, puede dar lugar a falsos resultados negativos (Poester, 2006) La sensibilidad de la prueba de 2-mercaptoetanol varía de 88.4 y 99.6%, y su especificidad de 91.5 y 99.8% (Nielsen, 2004)
Tipo de muestra	Suero
Interferencias/ observaciones	Inconvenientes incluyendo la toxicidad del mercaptoetanol, que requiere una campana extractora para su manipulación, y la posibilidad de degradación de IgG
Fijación del complemento (FC)	
Que identifica	Microtitulación en suero
Veracidad	Debido a su alta precisión, la fijación del complemento se utiliza como prueba confirmatoria para infecciones por <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> y <i>B. ovis</i> y es la prueba de referencia recomendada por la OIE para animales terrestres (OIE, 2004) Sin embargo se encuentran muchos reactores positivos (Aparicio-Bahena, 2003)
Tipo de muestra	Suero sanguíneo
Interferencias/ observaciones	Presenta limitaciones con suero hemolizado, muestras o suero con actividad anti-complemento de algunos sueros, y ocurrencia de fenómenos de prozona (Nielsen, 2004) Sensibilidad, la fijación del complemento oscila entre 77.1% y 100%, y su especificidad de 65% a 100% (Gall, 2001) (Perrett, 2010)

Rosa de Bengala (RBT)	
Que identifica	Reactivación de anticuerpos contra el lipopolisacárido liso (LPS)
Veracidad	Bajo. Especialmente en casos crónicos, una especificidad relativamente baja. La sensibilidad general es del 92.9%, por lo que el uso de RBT debe ser considerado cuidadosamente en áreas endémicas
Tipo de muestra	Suero sanguíneo
Interferencias/ observaciones	Las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Confirmación de la RBT por otros ensayos tales como pruebas de aglutinación sérica (Christopher, 2010)
ELISA Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas	
Que identifica	Detección de anticuerpos contra LPS liso. Detección de IgM
Veracidad	Es el más sensible en casos agudos y crónicos (Aparicio-Bahena <i>et al.</i> , 2003)
Tipo de muestra	Suero o leche
Interferencias/ observaciones	El Elisa indirecto no discrimina falsos positivos por vacunación (Gall, 2001) ELISA competitivo si discrimina anticuerpos pos vacunales (Perrett, 2010) (Godfroid, 2010)
Ensayo de polarización por fluorescencia (FPA)	
Que identifica	Diferencias entre una pequeña molécula de antígeno soluble en solución y el complejo de moléculas de antígeno con su anticuerpo. Mide el tamaño de una molécula marcada fluorescente tal como antígeno.
Veracidad	La sensibilidad de FPA es del 96% para la brucelosis humana confirmada por cultivo y la especificidad es de alrededor del 98% (Mitka, 2007) (Christopher, 2010)
Tipo de muestra	Suero Muestras de sangre (EDTA) entera y leche
Agar gel de Inmunodifusión	
Que identifica	Precipitación del complejo Antígeno-anticuerpo (Aparicio-Bahena, 2003)
Veracidad	Comparables al de fijación del complemento
Tipo de muestra	Suero sanguíneo
Interferencias/ observaciones	Sensibilidad en infecciones crónicas variabilidad de calidad. Antígenos disponibles. Necesidad de realizar pruebas complementarias (Costa, 2012)
Prueba de Coombs	
Que identifica	Esta es la prueba más adecuada y sensible para la confirmación de pacientes recurrentes con enfermedad persistente, detección de reacciones incompletas, de bloqueo o no aglutinantes. IgG.
Veracidad	Es bueno para casos complicados y crónicos, pero falla alrededor del 7% de casos comparados con ELISA (Sarigüzel, 2011)
Tipo de muestra	Suero sanguíneo
Interferencias/ observaciones	Requiere mucho tiempo, técnicamente difícil, requiere personal calificado y no rutinariamente realizado en laboratorios clínicos.
Dipstick assay	
Que identifica	El ensayo de la tira reactiva IgM es una de las pruebas que han de detectar anticuerpos IgM para el LPS liso.
Veracidad	Para detectar anticuerpos IgM contra las especies de <i>Brucella</i> . Mejora la interpretación de los resultados estableciendo así puntos de corte. (Lim M.L, 2004)
Tipo de muestra	Suero sanguíneo
Interferencias/ observaciones	-
Prueba de inmunocaptura de aglutinación (BCAP)	
Que identifica	Detectar aglutinantes y no aglutinantes. Anticuerpos con alta sensibilidad (Özdemir, 2011)
Veracidad	Comparado con el test de Coombs, tiene sensibilidad y especificidad

	similares, pero ambos pueden permanecer positivos durante mucho tiempo (Özdemir, 2011)
Tipo de muestra	Suero sanguíneo
Interferencias/ observaciones	Comparación con otras pruebas: es más compleja, costosa y lenta. Esta prueba difícilmente puede reemplazar las pruebas rápidas de detección tales como RBT y varilla.
Prueba rápida de aglutinación en tabla	
Que identifica	Aglutinación IgM
Veracidad	Se recomienda utilizar MAT y 2-ME / RSAT para verificar los sueros de todos los pacientes con síntomas de brucelosis, pero que son negativos para Brucelosis utilizando un antígeno de <i>Brucella</i> suave
Tipo de muestra	Suero sanguíneo
Interferencias/ observaciones	El diagnóstico rutinario de brucelosis no incluye <i>B. canis</i> en esta Investigación

Leptospira

La leptospirosis es una enfermedad contagiosa de los animales y de los humanos causada por cualquiera de los miembros patógenos del género *Leptospira*. El diagnóstico laboratorial de la leptospirosis puede ser complejo e implica pruebas que se dividen en dos grupos. Uno de los grupos de pruebas está diseñado para detectar los anticuerpos antileptospiras, el otro está diseñado para detectar leptospiras, antígenos de leptospiras o ácidos nucleicos de leptospiras en tejidos animales o en fluidos corporales. El conjunto de pruebas concretas seleccionadas depende del objetivo de la prueba (por ejemplo, los estudios de rebaños o el diagnóstico en un animal aislado) y de las pruebas o de la experiencia de la que se disponga en la zona (OIE, 2004).

El aislamiento de leptospiras a partir de material clínico y la identificación de los aislados constituyen una pérdida de tiempo, y son cometidos de los laboratorios de referencia especializados. El aislamiento seguido de la tipificación a partir de portadores renales es muy útil en los estudios epidemiológicos para determinar qué serovariedades están presentes en un grupo concreto de animales, en una especie animal o en una región geográfica. (OIE, 2004)

La demostración de la presencia de leptospiras o sus componentes en la sangre, tejidos y/o leche de animales con signos clínicos, tiene un gran valor diagnóstico (Ellis, 1996)). En el caso de animales muertos o sacrificados, las muestras que se deben enviar son cerebro, médula espinal, líquido cefalorraquídeo y ojo en casos con sintomatología nerviosa, y la mayoría de los órganos parenquimatosos en los casos que cursan con ictericia (Ellis, 1986). En animales vivos, se enviará sangre y leche en la fase aguda de la enfermedad y orina en la fase crónica. En los fetos, los órganos de elección son el hígado, riñón, cerebro, glándula adrenal y pulmón, así como cualquier fluido interno (C. Alonso-Andicoberry, 2001)

Diagnóstico de Leptospirosis

Tabla 3. Pruebas directas de diagnóstico de *Leptospira*.

Identificación de leptospiras/Aislamiento microbiano	
Tipo de muestra	- Los órganos internos (como el hígado, el pulmón, el cerebro y el riñón) y en los fluidos corporales (la sangre, la leche, los fluidos cerebroespinal, torácico y peritoneal) de los animales infectados clínicamente proporciona un diagnóstico definitivo de la enfermedad clínica aguda o, en el caso de un feto, de la infección crónica de la madre. (OIE, 2004) - El riñón, la orina o en el tracto genital de animales sin signos clínicos sólo es diagnóstico de un estado de portador crónico. (OIE, 2004)
Veracidad	Según el manual de la OIE dice que “El aislamiento de leptospiras a partir de material clínico y la identificación de los aislados constituyen una pérdida de tiempo, y son cometidos de los laboratorios de referencia especializados.
Dificultades	El aislamiento de leptospiras es el método más sensible de la demostración de su presencia, siempre que no haya residuos de antibióticos, que no haya autólisis avanzada del tejido, que los tejidos se manejen con rapidez para realizar cultivos después de su recogida y, en el caso de la orina, que tenga un pH adecuado. (OIE, 2004) Puede recuperarse leptospiras durante los primeros 10 días de enfermedad, en sangre, tejidos o LCR y posteriormente, en orina. Para ello, puede efectuarse cultivo en medios especiales, semisólidos, durante 5 a 6 semanas a 28-30 °C, en ambiente oscuro. (Zunino, 2007)
Tinción inmunohistoquímica/ inmunofluorescencia/inmunohistoquímica	
Tipo de muestra	Material patológico
Veracidad	El éxito de esta prueba depende del número de organismos presentes (Zunino, 2007) Es útil en casos que el material patológico sea inadecuado para realización de cultivos
Dificultad	Inapropiado en diagnósticos en el estado de portador crónico
Precaución	No es recomendable en el caso de necesitar un diagnóstico rápido Leptospira no se tiñe bien con colorantes de anilina Técnicas de argéntica carecen de sensibilidad y especificidad, pero constituyen un complemento útil para diagnóstico histopatológico (OIE, 2004)
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
Tipo de muestra	Tejidos y fluidos corporales (Zunino, 2007)
Veracidad	Los ensayos de PCR pueden ser bastante sensibles, pero la carencia de especificidad (es decir, resultados positivos falsos) puede representar un problema. El control de calidad de los ensayos de PCR utilizados para el diagnóstico de la leptospirosis requiere una atención especial en lo que se refiere al diseño y al volumen de trabajo del laboratorio para prevenir la contaminación de los materiales y al uso de muestras control apropiadas (Zunino, 2007)
Precaución	El procesamiento de la muestra para PCR es decisivo y debe ser adecuado para el tejido, el fluido y la especie que se esté analizando. Un procedimiento para la preparación de las muestras de orina para PCR en el que se emplean perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos contra las leptospiras promete un aumento en la detección de leptospiras patógenas en la orina (OIE, 2004)

Tabla 4. Pruebas indirectas de diagnóstico de *Leptospira*.

Pruebas serológicas para diagnóstico de <i>Leptospira</i>	
Método	Aglutinación microscópica (MAT)
Veracidad	Es la prueba serológica estándar no da reacciones cruzadas con otros patógenos, pero sí entre serovariedades (Lilenbaum W, 1995) (Moles.Cervantes, 2002) Muy útil en infecciones agudas, limitado en infecciones crónicas

Tipo de antígenos	Cepas representativas de los serogrupos endémicos en vez de cepas de referencia (OIE, 2004)
Interferencias/ observaciones	Los anticuerpos de las leptospiras aparecen a los pocos días del comienzo de la enfermedad y persisten durante semanas o meses y, en algunos casos, años. Desafortunadamente, los títulos de anticuerpos puede que caigan hasta niveles indetectables mientras los animales permanecen infectados crónicamente. Para superar este problema, se necesitan métodos sensibles que detecten el organismo en la orina o en el tracto genital de portadores crónicos. (OIE, 2004) Importante tener referencia con antígenos vacunales Debe comprobarse de forma regular la pureza del antígeno utilizado
Enzimoimmunoensayo	
Método	ELISA
Veracidad	En general, los ELISA son bastante sensibles, pero no tienen la especificidad de serovariedad de la MAT. (OIE, 2004)
Tipo de antígenos	En Europa se ha desarrollado y evaluado un ELISA que cuantifica la IgG y la IgM caninas frente a varias serovariedades de leptospira (OIE, 2004)
Interferencias/ observaciones	El papel más importante asociado a ELISA en el ganado es la utilización de un ELISA de la IgM para la identificación de infecciones recientes (COUSINS D.V., 1985) y para la selección de rebaños en regiones donde no se practica la vacunación para la leptospirosis. (OIE, 2004)

Diarrea viral bovina

Hay considerables variaciones en la *virulencia* de las distintas cepas aisladas del vDVB, las infecciones pueden ser inaparentes o tener un desenlace fatal. Sin embargo, no se han identificado marcadores de virulencia que permitan un sistema de clasificación de las cepas de campo en base a su patogenicidad (Paton, 1995). También, han sido infructuosos los intentos de correlacionar los signos clínicos con la agrupación filogenética de las distintas cepas aisladas. Debido al amplio tipo y severidad de lesiones inespecíficas, en ocasiones solo evidenciadas por microscopía, el diagnóstico se basa únicamente en el aislamiento del virus o detección del antígeno viral específico (Bielefeldt Ohmann, 1995). El objetivo principal del diagnóstico es la detección y remoción de bovinos persistentemente infectados (PI), principal fuente de infección y reservorio del virus.

Diagnóstico de diarrea viral bovina.

En Serología la distribución de anticuerpos en los distintos grupos de edades de rebaños con animales PI y sin animales PI con esto se ha permitido desarrollar diferentes métodos serológicos para la detección de rebaños con infección activa de rebaños sin bovinos PI con un alto grado de seguridad (Lértora, 2003)

Tabla 5. Detección del virus o componentes virales del DVB.

Aislamiento viral	
Tipo de reacción	La presencia de biotipos NCP se detecta con el empleo de anticuerpos anti-vDVB marcados con peroxidasa o fluorocromos (Sandvik, 1999).
Especificidad	100% específico y sensible
Dificultad	Económicamente prohibitivo en programas de control y erradicación (Dubovi, 1996)
Tipo de cultivo	El cultivo celular se ha optimizado con el sistema <i>microtitre multi-well</i> , donde células cultivadas en placas con múltiples pocillos inoculados
ELISA	
Tipo de reacción	<i>Detección de antígenos mediante enzimo-inmunoensayo (ELISA)</i> . Utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales para “capturar” antígenos del vDVB en muestras de sangre.
Especificidad	Comparado con el aislamiento viral, ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad (97,9% y 99,7% respectivamente) y es comparable a los sistemas ELISA que utilizan un pool de anticuerpos monoclonales (Ronsholt L, 1997)
Dificultad	Comparado con el aislamiento viral, es un método rápido y económico, por lo tanto, es el método de preferencia para la detección a gran escala de animales PI (Dubovi, 1996)
Detección de antígenos mediante inmunohistoquímica (IHQ).	
Tipo de muestra	En tejido fijado en formalina y embebido en parafina; aventajando a otras técnicas en términos de conveniencia en la remisión de las muestras, posibilita el estudio retrospectivo de muestras enviadas para examen histopatológico y permite una precisa asociación entre el antígeno viral con tipos celulares y lesiones histológicas (Dubovi, 1996)
Especificidad	Significativo número de resultados falsos positivos y falsos negativos con la inmunofluorescencia (sensibilidad: 77%, especificidad: 83%), y significativo número de falsos negativos con el aislamiento viral (sensibilidad: 83%, especificidad: 100%), mientras que la IHQ posee el mejor desempeño
Observaciones	Presencia del antígeno del VDVB en queratinocitos de la epidermis y células epiteliales de folículos pilosos de bovinos PI clínicamente normales ha originado el desarrollo de la técnica inmunohistoquímica en biopsias de piel para el diagnóstico de estos animales.
Detección del ácido nucleico viral. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
Especificidad	es un método rápido, sensible, que detecta diversos vDVB y permite investigar un gran número de muestras en corto tiempo (Ward P, 1991). Su sensibilidad permite detectar el virus en pool de muestras de sangre y leche de tanque (Renshaw RW, 2000). Sin embargo, su elevada sensibilidad puede originar resultados falsos positivos
Consideraciones necesarias	Para maximizar la detección de vDVB se han seleccionado partidores de la región 5' no codificante del genoma pestiviral, ya que es la región del genoma que más se conserva entre los virus aislados 51. Sin embargo, (Vilcek S, 2001), considerando la alta variabilidad, recomiendan un cuidadoso examen de los partidores para asegurar que sean capaces de detectar todos los virus del genotipo 1 del vDVB.

Neospora caninum

La identificación de anticuerpos a NC en un animal es indicativa de exposición al protozoo (53). Diversas pruebas serológicas tales como: inmunofluorescencia indirecta (IFI), el enzima inmuno ensayo (ELISA) y la microaglutinación (MA) han sido utilizadas para demostrar anticuerpos en el suero o en el fluido corporal de fetos.

Sin embargo, estudios recientes indican que algunos agentes infecciosos como la diarrea viral bovina (DVB) y la *Neospora caninum* son los agentes de mayor relevancia en la presentación del aborto en el ganado lechero (Rivera, 2001)

Tabla 6. Métodos serológicos para diagnóstico de *Neospora caninum*.

Inmunofluorescencia indirecta	
Especificidad	La sensibilidad y especificidad de la prueba varía de 82.4 a 97 % y 85.7 a 90 % respectivamente (Atkinson, 2000) Sin embargo, se ha sugerido utilizar una dilución de 1:200 para maximizar la sensibilidad
Dificultad	La interpretación de un resultado serológico es difícil por la variación que los niveles de anticuerpos poseen en hembras bovinas gestantes congénitamente infectadas tendiendo a incrementarse en el último trimestre de la gestación y decreciendo después del parto o aborto
Importante	La presencia de anticuerpos a NC en fluidos fetales no prueba que el aborto fue ocasionado por NC ya que muchos terneros clínicamente normales tienen anticuerpos congénitos
Enzimoimmunoensayo ELISA	
Especificidad	Al compararse el ELISA con la IFI, se logró un 95% de correlación, 96% de especificidad y 95% de sensibilidad
Dificultad	La facilidad para procesar un gran número de muestras, la obtención de una sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas con la IFI, sumado a la falta de subjetividad cuando se debe emitir un resultado, hacen confiable a esta prueba
Dificultad	El título de corte o el valor de absorbancia asignado a una prueba es motivo de controversia ya que depende de factores tales como composición del antígeno, anticuerpos identificados y de los conjugados utilizados (Dubey, 1997). Un determinado título o valor de corte debería ajustarse a cada circunstancia o situación epidemiológica
Microaglutinación	
Especificidad	Comparándose la técnica de microaglutinación e IFI, la sensibilidad y la especificidad que se obtuvo fue 100% vs. 98% y 97% vs. 99% respectivamente
Técnica	No requiere conjugados de difícil adquisición y permite analizar sueros de varias especies simultáneamente.

Tabla 7. Otros métodos para el diagnóstico de *Neospora caninum*.

Microscopía óptica	
Tipo de muestra	Histopatología sobre tejidos bovinos fetales
Diagnóstico presuntivo	En la descripción de abortos bovinos asociados a NC, (Helman, 1998) el diagnóstico presuntivo de aborto por NC puede emitirse ante la presencia de este tipo de lesiones: meningoencefalitis necrotizante multifocal, miocarditis, miositis, nefritis, hepatitis, neumonía, adrenalitis y placentitis no supurativas.
Observaciones	Este aspecto es relevante a los fines de adecuar el muestreo del encéfalo fetal para los análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos.
Inmunohistoquímica (IHQ)	
Tipo de muestra	Realizada sobre tejidos fetales formolados con lesiones histopatológicas compatibles, permite la identificación de NC con alta especificidad, adquiriendo valor diagnóstico relevante (Anderson, 1997) (Anderson M. A., 2000) (Campero, 2000)
Sensibilidad	Sensibilidad es baja, probablemente debido a los escasos parásitos presentes en tejidos autolizados, resulta una técnica diagnóstica vigente (Anderson M. A., 2000). Esta baja sensibilidad es avalada por la descripción de un caso donde se necesitaron 19 cortes para que uno de ellos resultara positivo por IHQ
Veracidad	Algunos investigadores han cuestionado el valor diagnóstico de la técnica IHQ describiéndose resultados positivos en fetos no abortados y terneros nacidos vivos (Barr, 1991)
Reacción en cadena de la polimerasa	
Especificidad	Extremadamente sensible y específica
	Aislamiento

Tipo de muestra	Aislamiento a partir de material del Sistema nervioso central A partir de fetos abortados es dificultoso debido a la severa autólisis de las células del hospedador, bajo número de parásitos presentes y alta probabilidad de contaminación (Conrad, 1993)
-----------------	--

Leucosis Bovina Enzoótica

Pueden existir varias causas de los linfosarcomas del ganado bovino, pero la única causa conocida es el retrovirus de la leucemia bovina (BLV), que origina la leucosis bovina enzoótica (LBE). El término leucosis bovina esporádica (LBES) se reserva normalmente para los linfomas de tipo cutáneo y tímico de los terneros, que se definen por la edad del animal afectado y por la distribución de los tumores. Se desconoce la causa o causas de la LBES. También hay condiciones linfosarcomatosas que no corresponden a las categorías de la LBES o la LBE, como el caso del linfoma multicéntrico de adultos, de aparición esporádica y de etiología desconocida. Solamente deben denominarse leucosis o Leucosis enzoótica bovina a los linfomas causados por infección con BLV. La leucosis bovina enzoótica (LBE) es una enfermedad del ganado bovino adulto causada por el retrovirus de la leucemia bovina (BLV). El ganado puede infectarse a cualquier edad, incluida la fase embrionaria. La mayoría de las infecciones son subclínicas, pero un porcentaje del ganado mayor de 3 años ($\approx 30\%$) desarrolla linfocitosis persistente y una pequeña proporción de linfosarcomas (tumores) en varios órganos internos. También se ha registrado infección natural en búfalos, ovejas y capibaras. Los síntomas clínicos, cuando se presentan, dependen de los órganos afectados. El ganado con linfosarcomas casi siempre muere súbitamente o en semanas o meses después de la aparición de los síntomas clínicos.

Los virus se pueden aislar por cultivo de linfocitos periféricos y la demostración del virus se puede lograr por microscopía electrónica o por pruebas de detección del antígeno de BLV. Por la reacción en cadena de la polimerasa se puede detectar el ADN del provirus en la sangre periférica o en los tumores. (OIE, 2004)

Tabla 8. Identificación del agente.

Aislamiento del virus	
Técnica	Las células mononucleares se aíslan en un gradiente de densidad a base de ficol/metrizoato sódico y se cultivan
Resultados	Se identifican los antígenos con radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoensayo (ELISA), inmunotransferencia o por inmunodifusión en gel agar (IGDA) y la presencia de partículas del virus de BLV y de provirus se puede demostrar por microscopía y por PCR respectivamente. (Hamilton, DM, & GH, 2003)
Reacción en cadena de polimerasa PCR	
Técnica	Se han descrito varios cebadores, pero el más sensible y rápido es la PCR doble (anidada) seguida con electroforesis y tinción
Tipo de	Los linfocitos de la sangre periférica (PBL) se separan de la sangre con EDTA utilizando el

muestra	método Ficoll- Paque de separación (Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Sweden). Alternativamente, se puede utilizar la capa leucocitaria o incluso sangre completa, por ejemplo, cuando las muestras se han congelado. (OIE, 2004)
Limitaciones	Se debe realizar solo en laboratorios que dispongan de virología molecular y con procedimientos y precauciones necesarias (OIE, 2004)
Veracidad	Se pueden reportar falsos positivos debido a contaminación entre muestras y falsos negativos debido a que solo una pequeña proporción de linfocitos periféricos resulta infectada lo que limita la sensibilidad del ensayo (OIE, 2004) Las pruebas que pueden detectar ácidos nucleicos virales codificados o proteínas virales codificadas pueden identificar animales que están incubando el virus, pero que no han desarrollado suficiente nivel de anticuerpos para ser detectados por serología (Evermann, 1992) (González, 2005)

Diagnóstico de leucosis Bovina enzoótica por medio de pruebas serológicas. -

La infección del ganado con el virus dura toda la vida y origina una respuesta persistente de anticuerpos, los cuales se detectan por primera vez a las 3-16 semanas post-infección. Los anticuerpos derivados de la madre pueden tardar de 6-7 meses en desaparecer.

Tabla 9. Pruebas serológicas.

Enzimoimmunoensayo (prueba prescrita para el mercado internacional)	
Técnica	Puede utilizarse ELISA indirecto o un ELISA de bloque
Tipo de muestra	Dependerá del tipo de Kit a utilizarse (suero o leche) Algunas pruebas son lo suficientemente sensibles como para utilizarse conjugada muestra de suero y leche (OIE, 2004)
Veracidad	Se puede determinar la sensibilidad de las pruebas ELISA para leches de mezcla utilizando los sueros estándar de la OIE que son débilmente positivos y negativos. Las pruebas deben dar resultado positivo con E4 cuando se diluye en leche negativa a una dilución de 250 veces el número de leches individuales de la mezcla (Directiva 88/406 de la Unión Europea). No puede distinguir anticuerpos calostrales y los de infección natural (González, 2005)
Inmunodifusión en gel agar	
Veracidad	Es específica pero no muy sensible para detectar anticuerpos en muestras individuales de suero La prueba AGID resulta un indicador confiable de infección por VLB y presenta un alto grado de especificidad debido en parte a la relativa estabilidad del genoma viral (OIE, 2004)
Limitantes	No debe utilizarse en leche a excepción del primer calostro
Observaciones	Es sencilla y fácil de usar usada como base de esquemas de erradicación

Rinotraqueitis infecciosa bovina

La rinotraqueitis bovina infecciosa/vulvovaginitis pustular infecciosa, causada por el herpesvirus 1 bovino (bHV1), es una enfermedad del ganado bovino doméstico y silvestre. El virus está distribuido por todo el mundo, pero se ha erradicado de Austria, Dinamarca, Finlandia, Suecia Y Suiza, y otros países han iniciado programas de control. (oie, 2004)

El virus se puede aislar de frotis nasales durante la fase aguda de la infección, y de varios órganos post-mortem. El examen post-mortem revela rinitis, laringitis y traqueitis. La enfermedad adopta su nombre por los síntomas clínicos más destacables

Se han desarrollado métodos de detección del ADN vírico y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa puede ser particularmente útil en estudios a partir de muestras de semen. (OIE, 2004)

Tabla 10. Métodos de Diagnóstico de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina

Aislamiento vírico	
Tipo de reacción	Se identifica por métodos de neutralización o de detección de antígenos con sueros monoespecíficos o anticuerpos monoclonales. Los aislamientos de BHV1 se pueden subtipar por análisis del ADN con enzimas de restricción. Efecto citopático característico de IBR. También se lo puede realizar con inmunofluorescencia o inmunoperoxidas. (OIE, 2004)
Dificultad	El suero empleado como suplemento del medio de mantenimiento debe estar libre de anticuerpos contra bhv1. El aislamiento de virus a partir del semen requiere algunas adaptaciones particulares, porque el fluido seminal contiene enzimas y otros factores que son tóxicos para las células e inhiben la replicación vírica
Tipo de muestra	Se pueden utilizar varios tipos de cultivos celulares. Resultan adecuadas las células primarias o secundarias de riñón de bovino, de pulmón o de testículos, las cepas celulares derivadas de pulmón fetal bovino, cornetes nasales o tráquea, y las líneas celulares establecidas, como la línea celular Madin-darby de riñón bovino. (oie, 2004)
Detección del antígeno vírico	
Tipo de reacción	En la prueba de inmunofluorescencia directa, el antisuero monoespecífico se conjuga con isotiocianato de fluoresceína, mientras que en el procedimiento indirecto es el segundo anticuerpo contra la inmunoglobulina bovina el que se conjuga al isotiocianato de fluoresceína.
Especificidad	La ventaja de esta técnica de detección de antígeno es que puede permitir el diagnóstico en el mismo día. Sin embargo, la sensibilidad de este procedimiento es menor que la del aislamiento del virus. En cada prueba se deben incluir controles positivos y negativos.
Tipo de muestra	Los hisopos nasales, oculares o genitales se pueden extender directamente, en portaobjetos de vidrio o bien, después de centrifugar
ELISA	
Tipo de reacción	El antígeno se puede capturar por MABS o por anticuerpos policlonales fijados a una fase sólida, generalmente el pocillo de una microplaca.
Especificidad	La ventaja de esta técnica de detección de antígeno es que puede permitir el diagnóstico en el mismo día. Sin embargo, la sensibilidad de este procedimiento es menor que la del aislamiento del virus. En cada prueba se deben incluir controles positivos y negativos.
Dificultades	Las desventajas radican en la menor sensibilidad de la detección directa del antígeno y en la necesidad extra de realizar el aislamiento del virus, si se necesita el aislado para estudios posteriores (OIE, 2004) Se debe probar juego de sueros bien definidos.
Detección del ácido nucleico PCR	
Tipo de muestra	En tejido fijado en formalina y embebido en parafina; aventajando a otras técnicas en términos de conveniencia en la remisión de las muestras, posibilita el estudio retrospectivo de muestras enviadas para examen histopatológico y permite una precisa asociación entre el antígeno viral con tipos celulares y lesiones histológicas (OIE, 2004)
Especificidad	La ventaja principal de que es más sensible y más rápida
Desventajas	Con la técnica de la PCR no es posible discriminar entre la infección con cepas IBR virulentas y la infección con otras cepas vivas atenuadas. Se han desarrollado PCRs que distinguen entre BHV1 Y BHV5 (OIE, 2004) Antes de que se reconozca internacionalmente a la PCR como un instrumento de diagnóstico adecuado Para el comercio internacional, deberá ser validada por una prueba comparativa entre diferentes Laboratorios. (OIE, 2004)

CONCLUSIONES

Es fundamental el uso de diagnóstico laboratorial en todas las enfermedades citadas ya que su sintomatología y ocurrencia depende del estado inmunológico del individuo.

Se debe tener muy en cuenta que algunas de estas enfermedades son oportunistas y adquieren un factor de virulencia al estar en contacto con otras enfermedades. Se debe tener en cuenta que cada una de estas enfermedades descritas tiene muchos factores que influyen en el brote sintomatológico por lo que se recomienda realizar un estudio más a fondo al respecto y no se debe tomar a este resumen como la última palabra en cuanto a diagnóstico se refiere.

BIBLIOGRAFÍA

- Al Dahouk, S. 2003. Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clinical laboratory*, 49(9-10), 487-505.
- Alonso-Andicoberry, F. 2001. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina. Revisión. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. Vol. 16 (2)*, 205-225.
- Anderson, M. 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210, 1169-1172.
- Anderson, M. 2000. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science* 60-61, 417-431.
- Aparicio-Bahena, A. 2003. Evaluación serológica y bacteriológica de un hato con brucellosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. *Tec Pecu Mex* 41(2), 129-140.
- Atkinson, R. 2000. Progress in the Serodiagnosis of *Neosporacanium* Infections of Cattle. . *Parasitology Today*. 16, 110-114.
- Boschiroli, M. 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current opinion in microbiology*, 4(1), 58-64.
- Bricker, B. 2002. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Veterinary microbiology*, 90(1), 433-434.
- Campero C. 2000. Diagnóstico de aborto bovino a *Neospora caninum* mediante inmunohistoquímica en rodeos de Argentina. *XXI Congreso Mundial de Buiatría Uruguay*, (pág. 95). Punta del este.
- Christopher S. 2010. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *Journal of laboratory physicians*, 2(2), 55-60.
- Costa E. 2012. Diagnosis of *Brucella ovis* infection by serology and PCR in urine samples from naturally infected rams in the State of Piauí. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64(3), 751-754.
- De Miguel, M. 2011. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1458-1463.
- Ewalt, D. 2000. Validation of the Abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation of *Brucella abortus* Field Strain Isolates and the Vaccine Strains, 19 and RB51. *Journal of clinical microbiology*, 38(8), 3085-3086.
- Gall, D. 2001. Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1), 110-118.
- Godroid, J. 2010. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian medical journal*, 51(4), 296-305.
- González E. 2005. Leucosis enzoótica bovina: evaluación de técnicas. *redvet. Revista Electrónica de Veterinaria*, VI (7), 12-20.

- Hamilton V. 2003. Translocation of the B-cell receptor to lipid rafts is inhibited in B-cells from BLV-infected, persistent lymphocytotic cattle. *Virology* 10, 315(1), 135-147.
- Jacobo, R. 2002. Diagnóstico serológico de brucelosis bovina: variaciones de resultados postvacunales. *Rev. Vet.* 12/13(1 y 2), 19-21.
- Lage A. 2008. Brucelose bovina: uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32(3), 202-212.
- Lértora W. 2003. Diarrea viral bovina: actualización. *Rev. Vet* 14:1, 42-51.
- Lim M. 2004. Brucellosis. *Infect Dis Clin Prac.* 12(1), 7-14.
- Martínez-Herrera, D. 2011. Evaluación de la Cepa S19 Brucella Abortus en el control de la Brucelosis bovina en Actopan, Veracruz, México. *Revista salud animal* 33 (1), 44-50.
- Mitka S. 2007. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. *Journal of clinical microbiology* 45(4), 1211-1218.
- Moles.Cervantes L. 2002. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 54 (1), 24-7.
- Nielsen K. 2004. Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to Brucella melitensis. *Rev. Sci. Tech*, 23(3), 979-987.
- OIE. 2004. *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres OIE*. París : Office International Des Epizooties.
- Özdemir, M. B. 2011. Dağı, Ş. Yüksekaya, & B. Baysal. 2011. A comparison of immunocapture agglutination and ELISA methods in serological diagnosis of brucellosis. *Int J Med Sci*, 8(5), 428-32.
- Perrett, L. 2010. Evaluation of competitive ELISA for detection of antibodies to Brucella infection in domestic animals. *Croatian medical journal* 51(4), 314-319.
- Poester F. 2006. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine* 24(25), 5327-5334.
- Queipo Ortuño M. 2005. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I based real time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clinical microbiology and infection*, 11(9), 713-718.
- Ramos-Vara, J. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42, 405-426.
- Redkar, R. 2001. Real-time detection of Brucella abortus, Brucella melitensis and Brucella suis. *Molecular and cellular probes* 15(1), 43-52.
- Renshaw RW, R. 2000. Comparison of virus isolations and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 184-186.
- Rivera, H. 2001. Causas frecuentes de aborto bovino. *Rev Inv Vet Perú* 12 (2), 117-122.
- Sarigüzel, F. 2011. Comparison of standard tube agglutination, coombs' and brucellacapt tests in the diagnosis of brucellosis. *New J Med*, 28, 113-115.
- Vilcek S. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146, 99-115.
- Whatmore A. 2007. Characterization of the genetic diversity of Brucella by multilocus sequencing. *BMC microbiology* 7(1), 34.
- Xavier M. 2009. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with Brucella abortus. *Journal of comparative pathology*, 140(2), 149-157.
- Zunino, M. 2007. Leptospirosis. A literature review. *Rev Chil Infect* 24 (3), 220-226.