## MANUAL DE REMISION DE MATERIALES PARA DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO.

TO A COMPANY OF THE PARTY OF A COMPANY OF THE PARTY OF TH

Dres. Armando Nari, Herculano Cardozo, Freddie Canábez, Jaime Berdie, Richard J. Bawden.

Ministerio de Agricultura y Pesca Centro de Investigaciones Veterinarias "Miguel C. Rubino" -Depto. de Parasitología-

La inespecificidad sintomatológica de muchas parasitosis, la lógica falta de medios del profesional de campo y la magia que en cierran las palabras "amplio espectro" para el productor, han colaborado para que muchos diagnósticos parasitarios aparezcan como algo oscuro.

En este sentido el Centro puede colaborar con el profesional de campo, poniendo a su disposición las técnicas actualmente utilizadas.

De los resultados y del registro de estos diagnósticos, se obtendrán bases para el desarrollo de proyectos de investigación que establezcan prioridades.

En esta guía se pretende comentar algunos conceptos sobre to ma y envío de materiales que es, en definitiva, el primer paso para llegar a un diagnóstico correcto.

\* <del>\* \*</del>

#### HELMINTOS

#### 1.1. Protocolo:

Los datos aportados ubican y orientan la labor del técnico - de laboratorio. Además de la usual identificación del propietario, establecimiento y profesional actuante, es de importancia la información siguiente:

- Fecha de extracción del material.
- Evolución y duración del problema.
- Número de potreros afectados: discriminar las muestras de acuerdo al potrero.

 $E_{1}$ 

Aprobado para su publicación por la Dirección del Centro. Noviembre 1975.-

- Dotación por especie y categoría de los potreros problemas:
  - Tipo de campo (pradera, campo mejorado, natural, etc.).
  - Tratamientos antihelmínticos previos, fecha, producto, do-sis.
  - Frecuencia anual de tratamientos antihelmínticos en el esta blecimiento.
  - Diagnóstico presuntivo.
  - Análisis requeridos.

## 1.2. Materias fecales:

Cualesquiera sea el análisis requerido, todas las materias fe cales tendrán que ser extraídas del recto.

#### 1.2.1. Muestra:

Debe ser lo más representativa posible (5 - 10 %) de - cada lote. Si la población a muestrear es muy grande, se pueden to mar iguales porcentajes de los animales que presenten mejor y peor estado. Cuando se mueven animales para la extracción, es posible - que hasta un 25% de ellos no presente materias fecales en el recto. En estos casos se aconseja apartar los animales en un pequeño piquete e intentar una nueva extracción luego de una hora.

## 1.2.2. Volúmen de la muestra:

De acuerdo a las técnicas disponibles en nuestro laboratorio, se recomiendan estas cantidades APROXIMADAS de materias fecales, gramos por animal.

	Minimo	Máximo
Bovinos	20	50
Ovinos	10	30
Equinos	10	20
Suinos	10	20

#### 1.2.3. Acondicionamiento de la muestra:

En todos los casos se evitará utilizar para el envío, materiales permeables (papel, cartón,). Los envases tienen que ser lo más herméticos posible, para evitar la entrada de oxígeno que facilite el desarrollo de los huevos. En la tabla adjunta se indica el envase preferido para cada tipo de muestra:

	Frasco	Bolsa de plás+ico
Bovinos		X
Ovinos	X	·
Equinos		X
Suinos	X	

El envío se realizará refrigerado, siendo suficiente la utilización de los refrigerantes usados para el transporte de vacunas.

# 1.2.4. <u>Tiempos máximos requeridos desde la extracción de la</u> muestra hasta su procesamiento:

Siempre es conveniente procesar las muestras lo más rá pidamente posible; se evita de esta manera, la eclosión de huevos, la proliferación bacteriana y fúngica y la deshidratación de las materias fecales.

Los tiempos máximos recomendados desde la extracciónal procesamiento son:

TECNICA	Mc Master	Willis	Contaje larvas	Baerman	Sedimentación F. Hepática
DIAS	3	3	5 (*)	2	9

(\*)Una prolongada falta de oxígeno puede afectar el desarrollo de larvas infectantes (L3) de parásitos gastro-intestinales.-

# 1.3. Autopsia Parasitaria (Parásitos Gastro-Intestinales):

Este caso se ha encarado como una extracción de muestra considerando que muchas veces el profesional no cuenta con el instrumental necesario para realizar la lectura.

#### 1.3.1. Material necesario:

- Dos baldes plásticos de capacidad aproximada de 10 11 tros.
- Dos frascos boca ancha (tipo Bracafé) de capacidad mayor de 600 ml.
- Cuchillo.
- Tijera punta roma ó mejor un enterótomo.

Les baldes plásticos quedan prontos para realizar la autopsia enrasándolos con una cantidad exactamente medida de agua (6 litros) y marcando sobre su pared externa, el nivel con un dry-

pen. La misma operación se realiza con los frascos de boca ancha, enrasándolos en 600 ml.

El balde representa el volúmen total del lavado; el frasco la alícuota (10%) que se enviará al Laboratorio.

## 1.3.2. Abomaso:

- Ligar y separar del animal abomaso e intestino delgado. Cada órgano debe lavarse por separado.
- Se abre el abomaso, dejando caer su contenido en el interior de uno de los baldes; el otro se destina a lavar cuidado-samente la mucosa con agua limpia.
- Verter el producto del lavado de la mucosa en el primer balde, repitiendo la operación hasta que la mucosa quede perfectamente limpia y el volúmen final enrasado en 6 litros. Si por accidente se llega a pasar el nivel, dejar decantar 30 minutos y sifonar el sobrenadante hasta el enrase.
- Observar lesiones (Haemonchus spp. Ostertagia spp.) e indicar los datos en el protocolo.
- Introducir el frasco de boca ancha dentro del contenido del balde utilizando su parte inferior como agitador.

-Cuando se observe una suspensión homogénea, se hunde más el frasco en el líquido, dejando entrar pequeñas cantidades, - siempre agitando. hasta que se enrase en 600 ml.

- Agregar 30 ml. de formol comercial.
- Individualizar la muestra, indicando a qué órgano co rresponde.

## 1.3.3. Intestino delgado:

- Asegurarse que el intestino quede libre de sus inser ciones peritoneales.
- Introducir agua por uno de sus extremos, dejándola caer, con el contenido del órgano, en uno de los baldes.
- Con una tijera de punta roma, abrir el intestino lon gitudinalmente.
- En los pasos siguientes se procede de la misma manera que para el abomaso.

#### 1.3.4. Intestino grueso:

Debido a su gran contenido de materias fecales, es con veniente hacer un tamizado previo con una malla de 80 hilos por — pulgada, individualizando y contando los parásitos directamente.No utilizar esta malla para lavados de cuajo e intestino delgado.

## 1.4. Otros órganos:

Cuando se sospechen larvas o parásitos pulmonares, remitir zonas del pulmón con lesiones, en frascos bien refrigerados. El hígado puede ser enviado en formol al 5% (zonas con lesiones) o todo el órgano refrigerado.

## 1.5. Interpretación de resultados:

- 1.5.1. Para que las técnicas aplicadas se traduzcan en un diagnóstico correcto, es necesario que las muestras esean extraídas y enviadas siempre de igual manera. Es importante no enviar parásitos digeridos, materias fecales extraídas del suelo, alícuotas provenientes de la mitad de un órgano, vísceras en mal estado. En estos casos los resultados no serán comparables.
- 1.5.2. El recuento de huevos puede ser utilizado bajo dos criterios: uno como complemento en la investigación, otro como auxiliar del diagnóstico. En el primer caso, los factores de error se reducen debido a la utilización de datos promediales a partir de numerosas muestras en el tiempo y una historia parasitaria conocida.

En un brote espontáneo, el problema parasitario es sólo un punto más dentro del diagnóstico diferencial y un contaje de huevos, aunque sea de una cantidad significativa de animales, no tiene validez comparativa con otros momentos de la vida del animal. Es importante por lo tanto, considerar que no hay técnicas de valor absoluto, sino complementarias a una anamnesis y observación elínica con criterio parasitario.

- 1.5.3. Ia susceptibilidad individual es un importante factor de variación. Nuestra experiencia indica, que en una misma majada de cría es posible encontrar ovejas con 5.000 h/gr. (promedio anual) y otra siempre con promedios inferiores a 200 h/gr. Si se parte de una muestra representativa, los resultados al tos o bajos, tendrán que tener una frecuencia alta dentro de la misma muestra. Un solo contaje alto dentro de la muestra no es suficiente para orientar un diagnóstico.
- 1.5.4. Cuantitativamente, las poblaciones parasitarias están íntimamente relacionadas con las categorías de huéspedes. El cordero, el borrego, el termero, el novillo de sobre-año, son considerados con mayor probabilidad de adquirir altas parasitosis. El capón y el novillo de más de dos años, son considerados como suficientemente resistentes. La oveja y vaca de cría son potencialmente peligrosas como fuente de infección para las categorías más susceptibles. Es importante relacionar el manejo del estable cimiento, sobre todo en dotación y categorías, con los resultados enviados por el Laboratorio.
  - 1.5.5. Cuando el problema parasitario se presenta en categorías de animales más resistentes, cabe esperar:

- Disminución o anulación de la postura en parte de los vermes.
- Poblaciones de parasitos que se mantengan en estado latente sin llegar a la madurez sexual.
- Prolongación del período prepatente con pérdidas de estado, sin manifestaciones visibles.

La presencia de grandes cantidades de huevos en las muestras, tiende a confirmar el diagnóstico; la ausencia o presencia de pocas cantidades de huevos no descarta definitivamente la acción de parásitos.

1.5.6. Para una categoría dada de huéspedes, las poblaciones parasitarias no se mantienen estáticas, sino que van fluctuando de acuerdo a las distintas estaciones del año. Por tan to, un contaje alto de huevos en verano, puede representar sólo un nos pocos parásitos si la base es Haemonchus spp. mientras que uno mediano en invierno, puede significar una gran cantidad de parásitos si la base es Trichostróngylus.

El clima determina la distribución geográfica y estacional de las poblaciones parasitarias; por eso cada país tiene que determinar su propio perfil parasitario, para darle mayor significado a los métodos disponibles de diagnóstico.

1.5.7. La autopsia parasitaria es, sin duda, el método más se guro de diagnóstico, aunque una simple observación macroscópica puede llevar a gruesos errores. Así, en intestino delgado de bovinos que han revelado unos pocos parásitos a simple —vista, se han encontrado a 60 aumentos contajes superiores a los 20.000 parásitos.

#### 2. FASCIOLA HEPATICA (HUESPED INTERMEDIARIO)

La fasciola hepática es un problema de potrero, no de establecimiento, debido a que se tienen que dar las condicionantes ecológicas para que viva y prolifere el huésped intermediario. Por tanto, el primer paso hacia la búsqueda del caracol tiene que ser la elección del potrero con mayores posibilidades de contener moluscos. Dentro del potrero se buscarán zonas húmedas, preferentemente vertientes con corriente lenta. Los caracoles no viven necesariamente en el agua; pueden ser encontrados a varios metros de distancia de la fuente (en la pastura) aunque siempre en lugares húmedos.

El envío para su clasificación se hará con todos los datos de ubicación, en frasco de boca ancha que contenga suelo húmedo.— La tapa debe tener orificios para permitir la entrada de oxígeno.

#### 3. HEMATOZOOARIOS

Frente a la sospecha de Babesia o Anaplasma son tres los materiales que deben ser enviados al Iaboratorio: frotis, sangre con anticoagulante y suero.

La selección del material se indica a continuación:

	PROTIS			SANG/ANTICOAG.	SUEROS		
	PUNTA	COLA	YUGULAR		CEREBRO		
	Fino	Grueso	Fino	Grueso			
BABESIA	X	X	X	X	X	X	X
ANAPL ASMA			X			Х	X

## 3.1. Frotis:

Para la confección de frotis se utilizará en todos los casos, láminas de vidrio de buena calidad, limpias y desengrasadas. Indicar con lápiz, en uno de los extremos, la categoría del animal y el tipo de frotis (yugular, cola, etc.).

#### 3.1.1. Frotis cola:

Cortar con tijera las cerdas de la punta de la cola, teniendo cuidado de obtener una buena limpieza utilizando un paño limpio. Con una lanceta se punciona la punta de la cola hasta obtener una gota de sangre.

#### 3.1.2. Frotis yugular:

Con la misma aguja de sangría, se obtendrá la sangre necesaria para el frotis.

## 3.1.3. Frotis de cerebre:

Se realiza una impronta de sustancia gris. Es de gran ayuda, sobretodo frente a una sospecha de B. argentina.

#### 3.1.4. Frotis finos:

Para poder ser interpretados no deberán tener más de 100 a 150 glóbulos por campo. Esto puede realizarse utilizando una gota pequeña y una lámina cubre-objeto para la extensión. El "cubre" formará con el "porta", un angulo de 30° a 45°. El secado se efectuará rápidamente agitando enérgicamente.

En todos los casos los frotis finos e improntas serán fijados en alcohol metílico durante cinco minutos. Indicar si serealizó la fijación.

Este procedimiento es indicado para animales con síntomas agudos. [93]

## 3.1.5. Frotis gruesos:

Se confeccionan extendiendo una gota de sangre de ángulo de 2-3 mm. de diámetro, en un área circular aproximada de 1,5 cm. de diámetro utilizando el de otro porta. La preparación resultante deberá ser traslúcida.

El secado se hace sin agitar la lámina y dejándola al aire libre, pero al abrigo del polvo. Este procedimiento es indicado para animales convalecientes.

## 3.1.6. Remisión:

Se realizará envolviendo cada frotis en papel, de modo de impedir que su superficie sea raspada y destruída.

## 3.2. Sangre con anticoagulante:

Se tratará de evitar el uso de anticoagulantes que puedan afectar la morfología de los eritrocitos tal como el citrato de so dio. El Centro proporcionará, a pedido de los interesados, EDTA o mezcla de WINTROBE, para los casos en que el profesional no pueda resolver el problema en su localidad.

## 3.3. <u>Suer</u>:

Ante la sospecha de Babesias o Anaplasmas, se enviarán muestras de sueros de un 20% del rodeo afectado con un máximo de 100 muestras por rodeo. Esta técnica no se realiza por el momento y cuando se dispongan de los antigenos necesarios se comunicará.

#### ECTOPARASITOS

#### 4. GARRAPATAS

El Centro está capacitado para procesar muestras enviadas con fines de clasificación y estudios de sensibilidad. Es de importancia, en estos casos, que cada muestra sea acompañada de la ubicación geográfica correcta, así como de todos los datos citados en 1.1.-

## 4.1. Clasificación:

Recoger varios ejemplares seleccionando, en lo posible los <u>á</u> caros más pequeños, ya que los próximos a caer presentan detalles específicos borrosos. Enviarlos en recipientes rígidos y bien cerrados, a los efectos de evitar escapes o aplastamientos. Es posible también enviar garrapatas en alcohol a 70°.

## 4.2. Determinación de sensibilidad:

Este tipo de muestra deberá reunir dos requisitos fundamenta les: ser numerosa (aproximadamente 100 ejemplares adultos) y llegar al Laboratorio dentro de las 24 horas de extraída.

## 4.2.1. Prueba de sensibilidad en teleóginas:

Da una idea general del comportamiento de una cepa de garrapata frente a concentraciones recomendadas de distintos garrapaticidas. El resultado puede ser contestado dentro de los 35 días.

## 4.2.2. Prueba de sensibilidad con larvas:

En este caso se utilizan larvas de 7-14 días de vida, obtenidas de la cepa problema enviada por el profesional de campo. Su fundamento es referir la sensibilidad de una cepa frente a otra considerada como patrón sensible a todos los garrapaticidas. El resultado puede ser contestado en el plazo de 60 días.

# 4.2.3. <u>Factores a considerar frente a una sospecha de resistencia:</u>

Ias técnicas enumeradas anteriormente, pueden resultar una pérdida de tiempo si la muestra no se envía bajo una SOS-PECHA FUNDADA DE RESISTENCIA.

Para ello es necesario descartar previamente:

- Correcta concentración del baño, determinada por análisis químico.
- Uso adecuado del baño. Esto implica que no pueden existir anima les SIN bañar, MAL bañados o baños en malas condiciones de conservación (rupturas, filtraciones, etc.).

#### 5. SARNA

Si fuera posible, obtener las muestras de <u>varios animales</u> en lugares donde las lesiones comiencen a ser patentes. Hacer un plie gue de la zona sospechosa, raspando con un bisturí y depositando-cuidadosamente el material dentro de un recipiente hermético. La toma de muestra para sarna tiene que ser por raspado <u>profundo y - de la periferia de las costras.</u>

#### OTROS ARTROPODOS

Es el caso de piojos, moscas, larvas de moscas, etc., deben enviarse en recipientes limpios, conteniendo alcohol a 70°.