



PRUEBA DE CAMPYLOBACTER POR INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA (Tomado del manual de procedimientos del CEDIVE)

Profesional del área de diagnóstico de enfermedades venéreas: Dr. Luis María Peralta, correo: luismaperaltavet@gmail.com

OBJETIVO

Determinar muestras **positivas** a campylobacter foetus sp.venerealis, foetus sp.foetus.

APLICACIÓN

Muestras ingresadas en administración bajo los siguientes estudios:

- venéreas (incluyen campylobacter ,tricomonas y brucelosis)
- venéreas 2 (incluyen campylobacter y tricomonas)
- Diagnóstico de campylobacter solamente (derivado de otros laboratorios que no procesan dicha muestra.)

GENERALIDADES

El diagnóstico de la campylobacteriosis bovina corresponde, junto con el de tricomonas, al diagnóstico de enfermedades venéreas, siendo ésta una rutina importante por el volumen de muestra sobre todo desde el mes de junio hasta octubre. La lectura de la IFD de campylobacter se realiza luego de una serie de pasos, ésta se lleva a cabo diariamente dependiendo de la cantidad de muestras. Además, el laboratorio produce el medio de transporte para los veterinarios y otros laboratorios que nos proveen de muestras.

1. INGRESO DE MUESTRAS AL LABORATORIO DE VENÉREAS



Las muestras provienen en su mayoría, de raspado prepucial de toros, no obstante, pueden recibirse también muestras de flujo vaginal (vacas), y de líquido abomasal (fetos). NO SE RECIBEN OTRO TIPO DE MUESTRAS (como por ejemplo lavados prepuciales, medios no identificados, muestras tomadas sin medio de transporte, jeringas, pajuelas, etc.), de llegar alguna muestra con estas características se debe consultar con el responsable del área.

Las muestras llegan al laboratorio junto con el FU-007, en bolsas de nylon o bien atadas mediante una banda elástica. Son depositadas en la cámara 1 puerta derecha segundo estante. Si la cámara estuviese llena, hay que depositarlas en la cámara 2 ubicada en la sala de necropsia.

De la cámara son retiradas todos los días (dependiendo la época) para su posterior ingreso al sistema informático y su procesamiento.

Ingreso de muestras al sistema

Acceder al sistema CEDIVE, utilizando para ello el usuario y contraseña asignados.

Ingresar en la opción "protocolo" - "ingreso de muestras"

Una vez en la ventana " carga de muestras al protocolo", clicar en el botón "buscar".

Ingresar el número de protocolo en el cuadro de búsqueda y seleccionar, con doble click, el protocolo de la lista. El protocolo se mostrará de color según:

- Blanco: no se ha seleccionado protocolo aún
- Rojo: no hay datos de animales cargados en ninguno de los estudios del protocolo.
- Amarillo: se cargaron datos de los animales en al menos 1 de los estudios requeridos



- Verde: se imprimió la planilla de trabajo de al menos 1 de los estudios requeridos
- Celeste: se informaron los resultados de al menos 1 de los estudios requeridos

NOTA: el sistema no tiene, actualmente, mecanismo para informarnos que faltan ingresar datos en algún estudio, ni en cuántos estudios se imprimió la planilla de trabajo o en cuántos se informaron los resultados. No al menos desde esta pantalla de ingreso.

Clickear el botón "agregar",. El sistema nos consultará si deseamos repetir el número de tubo, como número de animal. También nos preguntará si deseamos repetir los datos ingresados al resto de los estudios del protocolo (el primer área que cargue datos de animales, deberá copiar los datos al resto de los estudios)

NOTA: este paso debe revisarse desde el procedimiento, ya que las diversas opciones hacen que dependa mucho de subjetividades y de situaciones de control difíciles de registrar e identificar.

De la lista de estudios, seleccionar "diag. De campylobacteriosis"

Si los datos de las muestras ya se encuentran cargados, corroborar que los números de tubos coincidan y corregir las diferencias en caso de existir.

Si no hay datos en ningún estudio, tildar la opción de "repite en estudios" . En el caso de que las muestras estén ingresadas en al menos 1 estudio, no se debe repetir el ingreso, ya que estaríamos duplicando la cantidad de muestras en los demás estudios.



Si las muestras del protocolo se encuentran identificadas con números correlativos, ingresar el 1er número de la serie en el campo "nro. De tubo desde" y el último en el campo "hasta" (ubicado a la derecha del anterior)

Si por el contrario, las muestras no son correlativas, ingresar la serie con los números desde el 1 hasta el total de muestras que contenga el protocolo y modificar con los nros de tubos en cada celda correspondiente.

Importante: en caso de modificar las muestras y si se desea copiar las modificaciones en otros estudios, se debe tildar la opción "todos los estudios" antes de iniciar las modificaciones. Y al termina las mismas se debe clicar el botón "copiar a otros estudios".

Si los nros de animales y los tubos coinciden, se puede tildar la opción "repite nro. Ani/tubo", para que, al modificar los valores en tubo, se modifiquen también los animales o viceversa (esto sólo debe hacerse si el veterinario envía planilla de extracción indicando que los números de tubos son iguales a los del animal).

Una vez terminada la carga de tubos, clicar "gradilla", nos traslada a la planilla de carga de muestras en la gradilla. Se pone el nro. De gradilla que se va a dar lectura, y se pone el nro. Asignado por el laboratorio en la celda "nro. Asignado", luego: "confirmar", luego "salir".

Acá da paso a continuar la carga de muestras o si no hay más protocolos para cargar en esa gradilla, es el momento de la impresión de la planilla "gradilla" (que se usará en el microscopio, durante la lectura).

Una vez ya sea, para continuar la carga de muestras o para dar final al ingreso, se imprime la "planilla de trabajo"



2. ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

2. 01. Acondicionamiento de las muestras

Luego de retirar las muestras de la cámara correspondiente se procede al ordenado de las muestras por protocolo FU-007 (tener en cuenta que la cantidad de muestras indicadas en el formulario coincidan con las enviadas) y disponerlas en gradillas numeradas con capacidad para 200 tubos (las gradillas se encuentran ordenadas de la 1 a la 20 con una gradilla paralela en un mueble dispuesto en el laboratorio de venéreas).

Una vez ordenadas las muestras en gradillas siempre de izquierda a derecha y de abajo hacia arriba se le escribe un número interno a ese protocolo (FU-007) y a cada tubo tantas veces como muestras traiga ese protocolo, después de esto las muestras están listas para ser ingresadas al sistema informático (en época de muchas muestras se puede realizar la primera centrifugada sin el ingreso).

Primera centrifugada (se realiza en la centrifuga N° 1 con las tapas puestas) a 1000rpm durante 10 minutos. En la primera centrifugada buscamos precipitar el material grosero ya que hablamos de una muestra sucia.

Luego de la primera centrifugada, ordenar los tubos en la gradilla correspondiente, siempre por orden de protocolo, luego se realiza el pasaje del sobrenadante a un segundo tubo ubicado en el mismo orden en una gradilla paralela, éstos están identificados de a 200, por ejemplo, del 1 al 200, del 201 al 400, etc. El primer tubo debe ser depositado nuevamente en la primera gradilla, ya que de ésta va a depender el ingreso de las muestras, y si hubiera un positivo, la ubicación nos indicará la muestra, el establecimiento y veterinario al que corresponde. Para esto, la primera gradilla se guardará en el estante o se dejará en la mesada de trabajo para corroborar cualquier duda el día de la lectura.



NOTA: la cantidad de muestras no siempre debe alcanzar la totalidad de la gradilla para su procesado, esto va depender de la época del año, siempre teniendo en cuenta el vencimiento.

Una vez realizada la primera centrifugada y los tubos ordenados en la gradilla paralela se procede a la segunda centrifugada, para esto se puede utilizar la centrifuga N° 3 o N° 5. Esto será 5000 rpm durante 20 minutos (siempre tener en cuenta que los tubos estén equilibrados, si esto no fuera así utilizar agua destilada y pesarlos en balanza para equilibrar pesos. Esto es muy importante para el cuidado de las centrifugas).

Lo que se busca en la segunda centrifugada es el descenso en el fondo del tubo del campylobacter si estuviera. Terminada la segunda centrifugada se procede en el laboratorio de venéreas a tirar el sobrenadante en bidón de residuos líquidos del laboratorio y quedarse con la última parte (culot), luego se ordenan los tubos en la gradilla paralela (siempre por protocolo).

Ordenado los tubos en la gradilla se va a proceder al montado de las muestras siempre en orden de izquierda a derecha y de abajo hacia arriba, cada fila va a corresponder a un portaobjetos que va a llevar un numero (habrá tantos portaobjetos como filas ocupadas por muestras).

Importante las muestras deben ir acompañadas de un portaobjetos aparte llamado testigo (el testigo es comprado en LAB. Azul donde se adquiere el conjugado y se depositara como cualquier muestra en los cinco pocillos superiores). El testigo se obtiene de cultivo de campylobacter diluido en 1 ml. de formol al 40 %.

Para montar las muestras se necesita:

- AGITADOR (vortex)
- MECHERO
- ANSA



- PORTAOBJETOS (comunes donde se le pega un papel autoadhesivo con diez pocillos donde se depositarán las muestras).

El montaje propiamente dicho consiste en tomar con ANSA diez microlitos de cada tubo (recordar empezar de izq. A derecha). **Siempre** entre muestra y muestra quemar el ANSA para no trasladar un campylobacter, si lo hubiera, al próximo tubo). Recordar el máximo de montaje es de 200 muestra que corresponde a 20 portas por gradilla.

Luego de terminado de montar las muestras se dejan secar al lado del mechero, cuando estas están secas se fijan a la llama del mechero, esto consiste en pasar tres veces el portaobjetos sobre la llama tomándolo con pinza anatómica a 45° grados. Luego se guardan en placa de petri, la cual se identificará con cinta de papel con el número de gradilla y se guarda en heladera de bacteriología, esto en el caso de no leerse las muestras ese día.

2.02 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Preparación del conjugado:

Se compra en Laboratorio azul junto con el testigo (un mililitro en frasco de vidrio) cuando llega al laboratorio se le agrega un mililitro de glicerol, se mezcla y se guarda en freezer N° 3 (el agregado del glicerol permite que el conjugado se pueda mantener en estado líquido, esto nos permite usarlo cuantas veces quiera en el día sin la pérdida de potencia entre congelada y descongelada).

Para el preparado diario de conjugado se tiene estandarizado una dilución que se explica en manual de soluciones de campylobacter.

Para dicha dilución se tiene preparado frasquitos con diluyente con cantidad de un mililitro guardado en gradilla metálica sobre la mesada de trabajo.



Solución de trabajo: se adiciona cuarenta microlitos de conjugado que se encuentra en freezer a un mililitro de diluyente. El frasco que contiene la solución de trabajo siempre debe estar envuelta con papel metálico (la solución de trabajo se prepara diariamente, si quedara algún resto se guarda en heladera de bacteriología con fecha de preparado).

Adición del conjugado: Para poner el conjugado se utilizará micro pipeta con volumen para diez microlitos que se deposita en cada pocillo, luego se ordenan los portas y se acondicionan en cámara húmeda (taper con gasa húmeda) y va a estufa a 37°C durante 50 minutos (lo que se busca es la unión del conjugado al campylobacter si lo hubiera). Luego procede al lavado con sol. Salina (Ver formula en manual).

Lavado: se depositan los portaobjetos ordenados cuidando que la solución tape la totalidad de los portaobjetos, esto se realiza durante diez minutos (se busca eliminar el exceso de conjugado que no se unió).

Importante: el lavado debe ser al resguardo de la luz (habitación de lectura para inmunofluorescencia).

Terminado los 10 minutos se sacan los portaobjetos del lavado y se deja al resguardo de la luz, al lado del microscopio para su secado y próxima lectura, en caso urgente se pueden secar con papel TISSU.

Antes de la lectura se le agrega glicerol (formula en manual de soluciones) para buscar mayor refringencia y por último un cubreobjetos.



3. LECTURA Y CONFECCIÓN DE INFORMES

3.01. Lectura de las muestras

Primero se debería ver el testigo para evaluar forma y fluorescencia del campylobacter (Figura 1).

Luego de leer el testigo se puede comenzar a leer las muestras siempre con planilla de lectura al lado.

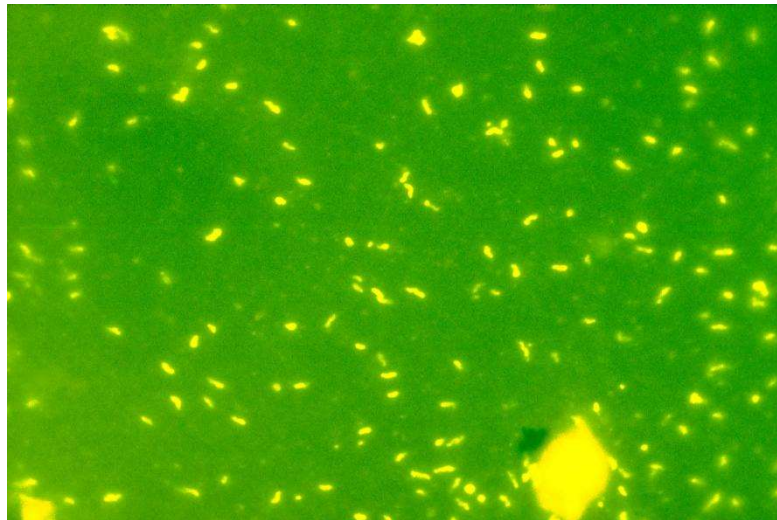


Figura 1. Inmunofluorescencia directa de campylobacterias, vista 100X. Imagen del CEDIVE.

3.02 Registro de Resultados

Los resultados se anotan en la planilla de trabajo que surge del ingreso y control de las muestras en el sistema. Para ello, si las muestras resultaron todas negativas se traza una línea vertical que abarque a todos los casilleros (en todos los protocolos que correspondan al número de gradilla leída). En el pie de la planilla se debe dejar anotado fecha y responsable de la lectura. En el caso de encontrarse algún **positivo** con planilla de lectura en mano que representa gráficamente la gradilla se buscara según el número de porta y pocillo la muestra que tendrá un numero interno y con este sabremos el protocolo y veterinario a que corresponda, lo buscamos en la planilla de



trabajo y se resalta con fluorescente (en el caso de alguna duda se hablará con el responsable del área, el cual dispondrá si se procesará nuevamente la muestra).

Luego de la lectura, la gradilla paralela se guardará junto a la gradilla madre en el mueble, en su ubicación correspondiente donde se guardará por un periodo de 20 días por algún reclamo.

Transcurrido los 20 días se tirarán los tubos en bolsas rojas que se depositan en la cámara 1 de necropsia.

IMPORTANTE: SE DEBERIA TENER EN CUENTA N° DE MUESTREO E HISTORIAL DEL ESTABLECIMIENTO PARA CASUISTICA Y SEGIMIENTO DE LOS RODEOS.

3.03. Confección de informe.

De la carpeta "Planilla de trabajo", se retiran los informes de las gradillas que fueron leídas, se ingresa al Sistema CEDIVE, y dentro de éste a las opciones "Protocolo, ingreso de muestras". Presionar sobre el botón "buscar" e indicar el número de protocolo que se quiere informar. Al desplegar el menú de estudios aparecen todos los estudios para el protocolo cargado, se selecciona "campylobacteriosis", presionar el botón "cargar estudio" y completar los resultados en "campy". Tildar las opciones "ordenar columnas": "descendente"