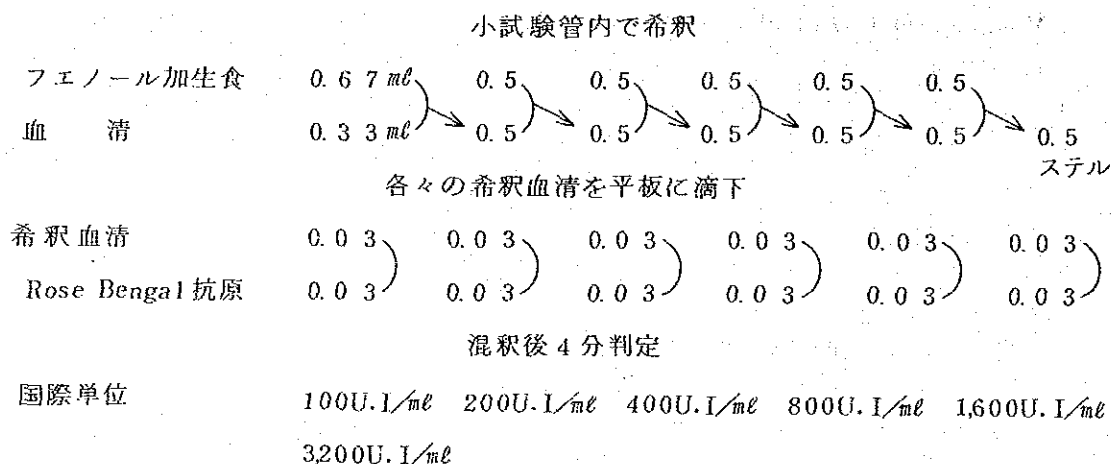


### 3. Rose Bengal 法 (Card test) の変法と 2 ME 法との比較

Rose Bengal 法で反応した血清を希釈し、それぞれ Rose Bengal 抗原を滴下し、国際単位を求める方法を検討した。

また Rose Bengal 法はいわゆる IgG 抗体を主に検出する方法であるが、2 ME 法が IgG 抗体を特異的に検出する方法として実施されている。そこでそれら両者との結果を統計処理しその一致性について検討を試みた。かなり高い一致が認められ、IgG 抗体を求める際 2 ME 法で実施すると 4-8 時間後に判定となる。この Rose Bengal 法の変法で実施すればわずか反応時間 4 分で結果を求めることが出来、急を要する場合の便法として用いることが出来ること、また同時に国際単位の意味について理解を深めることが出来たと確信する。

#### 1) Rose Bengal 法の変法



#### 2) 2 ME 法の国際単位

血清希釈	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1,600	1:3,200
国際単位	25I.U	50	100	200	400	800	1,600	3,200

Rose Baugal の変法と  
2ME法の比較

図 1

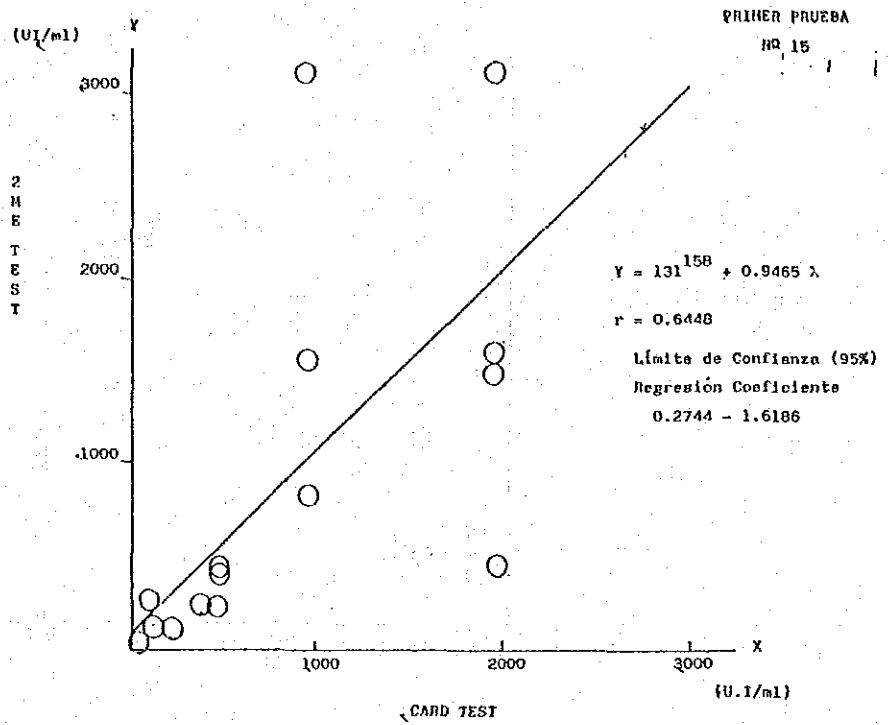
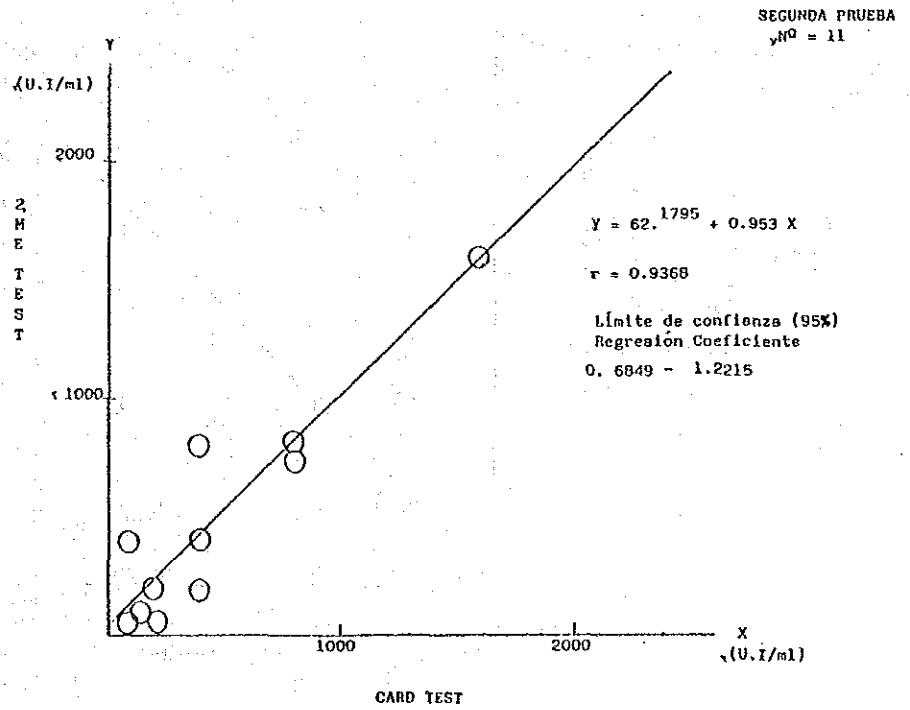
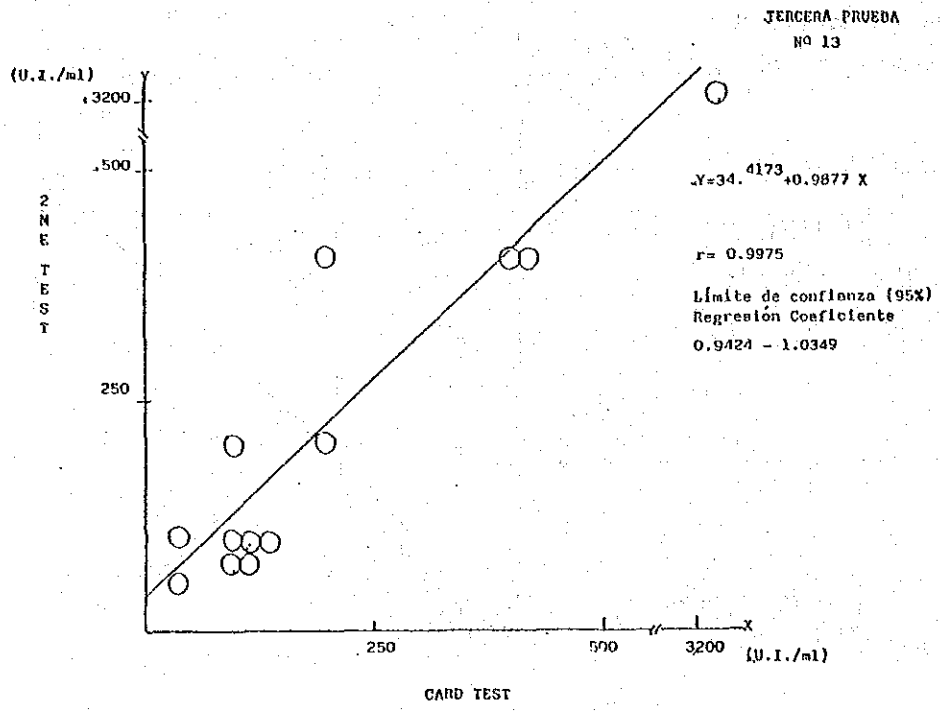


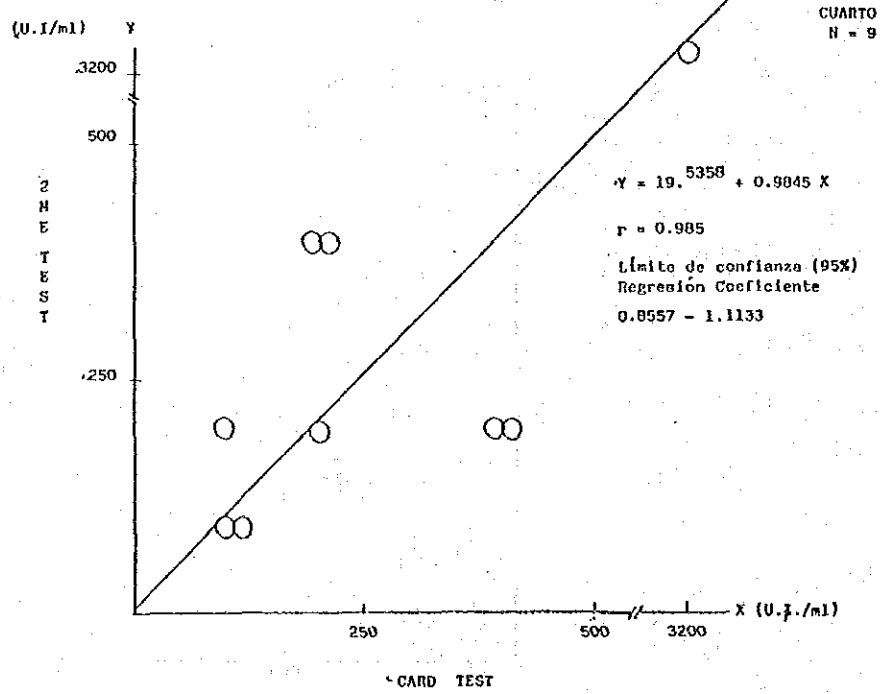
図 2



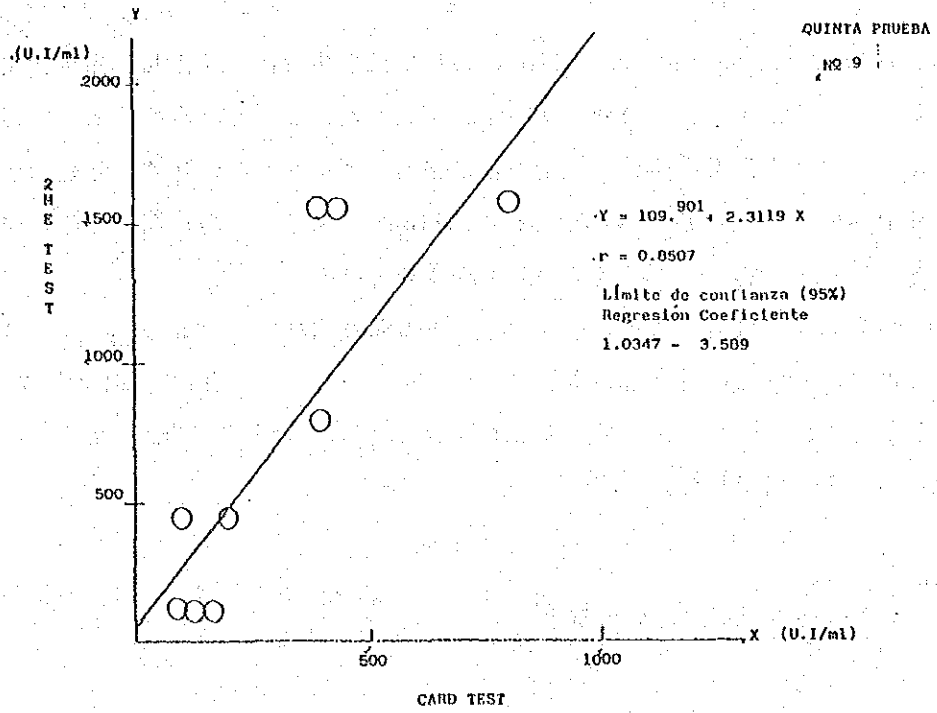
3



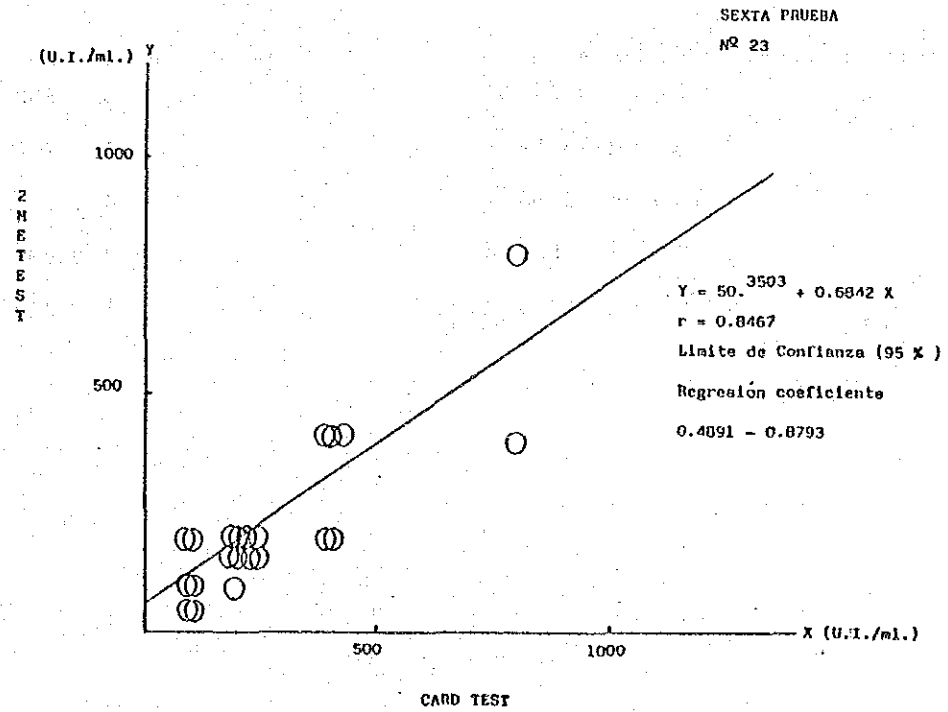
4



☒ 5



☒ 6



#### 4. ヘモリジンの作成

綿羊血球をアルスパー液にて採血し、それを滅菌生食にて洗浄し、濃度、接種間隔を変え兎の耳静脈から接種し、ヘモリジンの作成を試みた。またそれらを使用して補体結合反応を試みた。これらの作業を通じ、綿羊からの採血、アルスパーの調整、分光光度計を使用した2.8%血球の調整法、PS-AgのBoxtitration、ヘモリジンの検定、補体の作成、補体の検定等反復練習することにより技術の向上が認められた。

CF法は現行法では入っておらず、その取り入れについては、パ国側の規則改正に係わることなので容易に出来ない事が解った。またセナクサの勤務時間体制(7:00~13:00)からして、ルーティンワークとして取り入れるのは困難で高価な種雄牛などの判定に使用していくよう提案した。

##### 1) ヘモリジン作成の結果

表 3

(ヘモリジンの製造)

ロット	月 時	兎 頭 数	結 果
1	15-I-al-127-II-86	1	1/1,500 U.I.
2	5-III-al-15-IV-86	1	1/750 U.I.
3	2-V-al-16-VI-86	1	1/500 U.I.
4	22-VII-al-VIII-86	1	1/2,000 U.I.
5	22-VII-al-13-VIII-86	1	1/2,000 U.I.

2) 綿羊血球の兎への接種プログラム

c) ELABORACION DE HEMOLISINA EN CONEJO

表 6

(LOTE Nº 3)

FECHA DE INOCULACION	CANTIDAD EN ML.	RBC%
1) 2 - V - 86	1 ML.	0.5 %
2) 7 - V - 86	1 ML.	1.0 %
3) 12 - V - 86	2 ML.	2.0 %
4) 16 - V - 86	3 ML.	5.0 %
5) 21 - V - 86	3 ML.	5.0 %
6) 26 - V - 86	5 ML.	5.0 %
7) 30 - V - 86	7 ML.	5.0 %
8) 16 - VI - 86	EXTRACCION DE SANGRE - CENTRIFUGA	

a)

METODO DE HACER HEMOLISINA

表 4

(LOTE Nº 1)

TIEMPO	FECHA INOCULACION	METODO INOCULACION
1	15 - I - 86	INTRAVENOSO; GL. ROJO - OVEJA 0.5 X 1 ml.
2	20 - I - 86	1.0 X 1 ml.
3	24 - I - 86	1.0 X 2 ml.
4	29 - I - 86	2.0 X 3 ml.
5	4 - II - 86	5.0 X 3 ml. EXTRAER SANGRE 10 ml.
6	10 - II - 86	5.0 X 7 ml. SACRIFICAR EL CONEJO
7	27 - II - 86	EXTRACCION DE SANGRE - CENTRIFUGA.

OBS: TITULACION DE HEMOLISINA 1 : 1.500 U.I./ml.

b)

ELABORACION DE HEMOLISINA EN CONEJO

表 5

(LOTE Nº 2)

FECHA DE INOCULACION	GL. ROJO DE OVEJA
1) 5 - III	0.5 X 1 ml.
2) 10 - III	1.0 X 1 ml.
3) 14 - III	1.0 X 2 ml.
4) 19 - III	2.0 X 3 ml.
5) 25 - III	5.0 X 3 ml.
6) 31 - III	5.0 X 7 ml.
7) 15 - IV	EXTRACCION DE SANGRE

OBS: EL GL. ROJO OVEJA DILUIR EN SOLUCION SALINA ESTERILIZADA.

表 6

d) (Lote.4)		PRODUCCION DE HEMOLISINA
1.	DIA 22 - VII	1) 0.5 ml. I.V. RBC 5%
2.	"	
3.	" 24 - VII	2) 1 ml. I.V.
4.	"	
5.	" 26 - VII	3) 2 ml. I.V.
6.	"	
7.	" 28 - VII	4) 3 ml. I.V.
8.	"	
9.	" 30 - VII	5) 4 ml. I.V.
10.	"	
11.	" 1 - VIII	6) 5 ml. I.V.
12.	"	
13.	" 3 - VIII	7) 6 ml. I.V.
14.	"	
15.	"	
16.	"	
17.	"	
18.	" SACAR SANGRE	
19.	"	
20.	" SACAR SANGRE	

表 7

e)		PRODUCCION HEMOLISINA	(LOTE Nº 5)
GLOBULO ROJO DE OVEJA		RBC 10 X	(10 ml. GLOBULO ROJO 90 ml. P.B.S.)
1 DIA	22 - VII - 86	1)	5 ml. I.V.
2 "	23 - VII - 86	2)	5 ml. I.V.
3 "	24 - VII - 86	3)	5 ml. I.V.
4 "	25 - VII - 86	4)	5 ml. I.V.
5 "	26 - VII - 86	5)	5 ml. I.V.
6 "	27 - VII - 86	6)	5 ml. I.V.
7 "			
8 "	30 - VII - 86	7)	10 ml. I.V.
9 "			
10 "	1 - VIII - 86	8)	10 ml. I.V.
11 "			
12 "	4 - VIII - 86	9)	10 ml. I.V.
13 "	5 - VIII - 86		
14 "	6 - VIII - 86		
15 "	7 - VIII - 86		
16 "	8 - VIII - 86		
17 "	9 - VIII - 86		
18 "	10 - VIII - 86	SACAR SANGRE	(SE SANGRO EL 14 - VIII - 86)
19 "	11 - VIII - 86		
20 "	12 - VIII - 86		
21 "	13 - VIII - 86	SACAR SANGRE	

OBS: Titulación de Hemolisina 1:2000 u.

OBS: Titulación de Hemolisina 1 : 2000 u.

SE SANGRO EL 14 - VIII - 86

## 5. チャコ地方における山羊ブルセラ病調査

チャコ地方では、ほとんどの家庭で山羊を飼育し、山羊乳(生)を飲む習慣がある。人のブルセラ病がパ国熱帯病研究センター(JICA順天堂大学が技術協力及び無償供与)にて、臨床的診断で報告があった。また農牧省の家畜衛生センター(英国家畜衛生センター)の細菌部より、チャコ地方の緬羊から *Brucella Melitensis* Biotype II の分離報告例があった。山羊からの *Brucella Melitensis* の分離を目的に山羊ブルセラ病調査が計画された。セナクサにて今まで *Brucella abortus* の分離例があるが型別は CEPANZO(WHO)にて実施されていた。1987年5月に開催される南米全域のブルセラ病、結核、狂犬病に関する国際会議に向けて、パ国自から実施した調査報告を提出したい背景があった。今回は山羊の調査であったが引き続き、牛(牛乳)及び豚からの分離同定の計画があったので次期永田専門家に引継いだ。

今回の調査で我々は1頭の殺処分山羊から *Brucella Melitensis* Biotype I を分離、同定することが出来た。なお分離株は CEPANZO(WHO)に送付して、Br. *Melitensis* Biotype I である事を確認した。

### 1) チャコ地方ブルセラ調査メンバーと月日

#### a) メンバー

JICA expert	西野重雄
ブルセラ研究室長	Dr. Julio Ruben Branbilla
T B研究室長	Dr. Pablo. H. Caballero.
大学獣医学部緬山羊科長	Dr. Espinola.
その他	チャコモロニーターブルセラプログラム室長、セナクサー フィラデルフィア所長

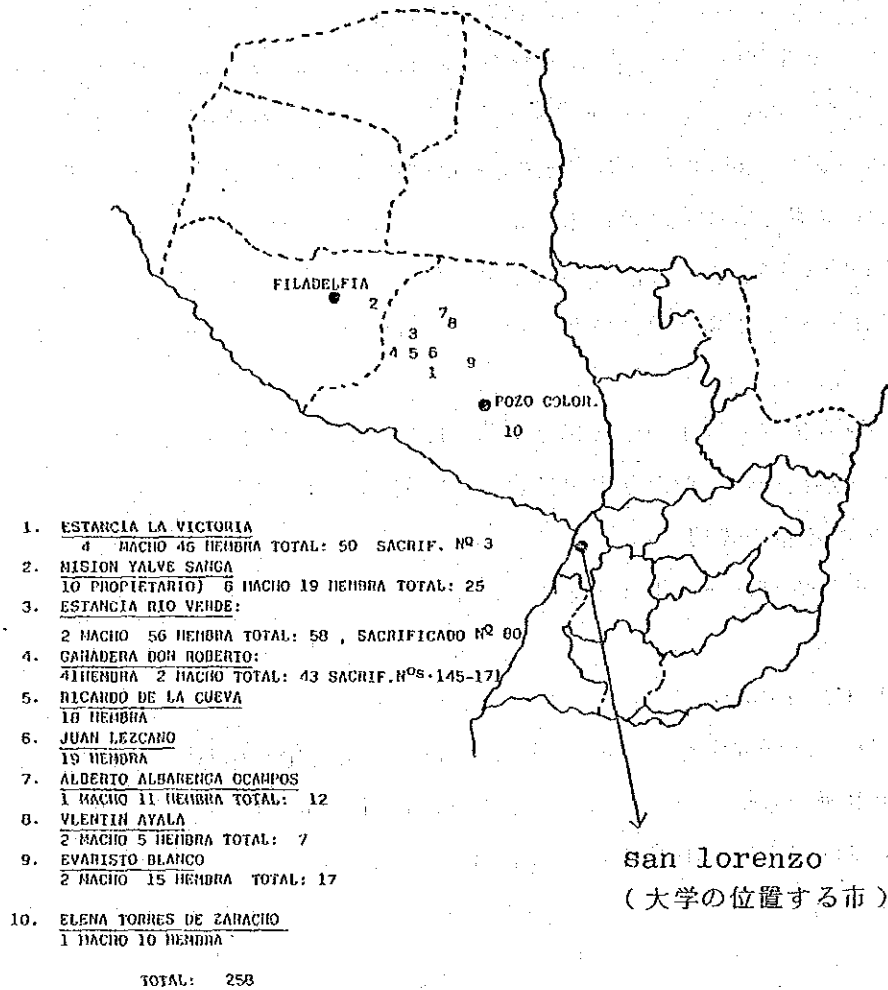
#### b) 1986. 8. 5 ~ 8. 8

### 2) 採材場所、採材頭数、及び殺処分頭数

現場にて採血し、血液 0.03 ml と Rose Bengal 抗原をガラス平板上で反応させ、特に反応が早く強い例を畜主の許可を得て、その場で解剖し、リンパ節をはじめ主要臓器及び腔粘液等を採材した。全頭で 258 頭採血し、10ヶ所にて実施した。図7の2の Mision YALVE SANGA 地区からは、1家で4~5頭飼育しているだけで、6ヶ所(6家族)から採材した。特にこの地区は原住民であるシュルピ族で山羊の生乳を飲む習慣を持っている。この地域にて、人ブルセラ病(臨床的診断)と診断された例が2~3報告されていた。殺処分例は、3地区計4頭実施した。



図 7



### 3) 血清反応検査

10地区より雄30頭、雌228頭、計258頭実施した。ワクチン接種されている例は認められなかった。陽性6頭(2.3%)、疑陽性2頭(0.8%)で想像したより低い汚染度であった。陽性限度は、TAO/WHOブルセラ病専門委員会の勧告の通り50国際単位を陽性とした。

牛と同じくローズベンガル、試験管凝集、2ME法等の血清反応を実施した。この中で *Br. melitensis* Biotype I が分離されたのは、№4のGANADERA DONROBERTO 牧場からの2頭殺処分中の1頭№171からである。この牧場では70頭の山羊を飼育していて、この牧場を管理している家族の主婦がブルセラ病と診断され、加療されている。この家族も山羊の生乳を摂取することを習慣としていた。

#### a) 分離例個体の血清反応結果(№171)

平板凝集反応……………1:100

試験管凝集反応……………1:200

2ME……………1:200

Card test……………Positive

#### b) 全体の血清反応結果

表8

牧 場	頭数	雄	雌	疑陽性	陽 性
1. - LA VISTORIA	50	4	46	2 (4%)	3 (6%)
2. - MISION YALVA SANGA	25	6	19	0	0
3. - RIO VERDE	58	2	56	0	0
4. - GANADERA DON ROBERTO	43	2	41	0	3 (7%)
5. - RICARDO DE LA CUEVA	18	-	18	0	0
6. - JUAN LEZCANO	17	-	17	0	0
7. - ALBERTO ALBARENGA OCAMPOS	12	1	11	0	0
8. - VALENTIN AYALA	7	2	5	0	0
9. - EVARISTO BLANCO	17	2	15	0	0
10. - ELENA TORRES DE ZARACHO	11	1	10	0	0
TOTAL	258	30	228	2 (0.8%)	6 (2.3%)

#### 4) 分離について

馬血清—ブドウ糖加トリプトソイ寒天培地 (Serum Dextrose Aggr.)

トリプトソイ寒天 (BBL) ..... 40 g

馬血清 (濾過滅菌済) ..... 50 ml

非働化 (56°C 30分)

20%ブドウ糖 (110°C 10分滅菌) 40 ml

蒸留水 ..... 1,000 ml

とこのSDAに Bacitracine (25 u/ml) Palmyxim B (5 U/ml) Vancomycin (25 mg/ml)、Cieloheximide (100 mg/ml)、Nalidixic Acide (5 mg/ml)、Nigtain (100 U/ml) 等を加えた。Farrell's の変法培地にそれぞれリンパ節の割面、主要臓器の割面を塗沫培養、さらに、腔粘液を採取したタンポンを直接塗沫したプレートそれぞれ10% CO<sub>2</sub> 培養 (37°C)、及び普通37°Cにて培養した。48時間後に腔粘液材料を塗沫したPlateと乳房リンパ節、腸骨リンパ節より純培養に近い型で、10% CO<sub>2</sub> 培養にて出現した。ガス無し培養では48 hrs 後は明確でなかったが、72 hrs に明確になった。すぐにグラム染色、Gram(-)、小桿菌及びブルセラ免疫家免血清、(B. abortus, B. melitensis, B. ovis, B. canis) とでためし凝集を実施した所 B. abortus, B. melitensis に対して凝集を示したので单相免疫血清 A. M に対して凝集試験を試みたところ M に凝集を示した。そこで性状、型別をあたるべく検査に入った。検査に入るにあたり継代をしたところ、48 hr で10% CO<sub>2</sub> 及び好気培養ともにコロニーが明確になった。性状・型別をあたる際に標準株として Brucella abortus 544株 (Biotype I), Brucella melitensis M16 (Biotype I) を使用した。今後の問題として、実験室のバイオハザードを如何に防除するかを解決されねばならなかった。

5) 分離株の性状について

0.1 ~ 1 mmの白黄色コロニー

円型、スムーズ型、

表 9

CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA AISLADA					
MORFOLOGIA DE LAS COLONIAS: REDONDAS, LISAS, TRANSLUCIDAS 0,5-1 MM DE DIAMETRO BLANCO AMARILLENAS					
TINCION DE GRAM: COCOCACILOS GRAM - NEGATIVOS					
	CEPA AISLADA 分離株	CEPA DE REFERENCIA BRUC. MELIT.116 (BIOT.1)	CEPA DE REFERENCIA BRUC. ABORTUS544 (BIOT. 1)		
a	発育温度	-TEMPERATURA DE CREC <sub>1</sub>	37°C	37°C	37°C
b	CO <sub>2</sub> 要求性	-REQUERIMIENTO DE CO <sub>2</sub>	-	-	+
c	運動性 O/F	-MOTILIDAD -O. F TEST	-	-	-
d	カタラーゼ	-PRODUCCION DE CATALASA	+	+	+
e	オキシダーゼ	-PRODUCCION DE OXIDASA	+	+	+
f	HH <sub>2</sub> Sの産生	-PRODUCCION DE H <sub>2</sub> S	-	-	+
g	アクリフラビンによる凝集	-ACRIFLAVIN TEST-AGLUTIN	-	-	-
h	ウレアーゼテスト	-UREASA TEST	+	+	-
i	3型抗血清によるためし凝集	-AGLUTINAC CON SUERO, ANTBRUC LISAS	+	+	+
j	R型抗血清	-SUERO ANTBRUC RUGOSAS	-	-	-
k	血清要求性	-REQUER. DE SUERO P/SU, CREC.	-	-	-
l	チオニン(1/600)感受性	-CREC. EN PRESENCIA DE COLORANTE 1-TIONINA 1=600	-	-	+
m	塩基性フクシン(1/200)感受性	2-FUCSINA 1=200	-	-	-
n	単相抗血清凝集素M	-AGLUTINACION CON SUERO MONOESPE. ANTI-M	+	+	-
n	" A	N -ANTI-N	-	-	+
p	フェージテスト	-LISIS POR FAGOS EN RTD			
q	TB	TB	NL	NL	L
r	WB	WB	NL	NL	L
		-HUESPED	CABRA	CABRA,	BOVINO OVEJA

同定結果; *Brucella melitensis* Biotype I

次頁にある通り CEPANZO/WHOにより再確認された。



1025

OFICINA SANITARIA PANAMERICANA  
OFICINA REGIONAL DE LA  
ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

## CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS

CASILLA 3091 - CORREO CENTRAL - BUENOS AIRES - REP. ARGENTINA 汎アメリカ人畜共通伝染病センター  
TEL. 2241010 - DIRECCION TELEGRAFICA: CEPANZO

CPZ/ZNS/O10/2207/ZB/B-86

30 de septiembre de 1986

CEPANZO (WHO) からの  
6) ブルセラメリテンジス Bio Typ I の確認通知

Dr. Juan Pablo Romero  
Presidente  
SENACSA  
Casilla de Correo N° 1110,  
Asunción - PARAGUAY

<b>SENACSA</b>	
MESA DE ENTRADAS	
No.	384.-
Fecha:	13/9/86-
Hora:	9:00.-

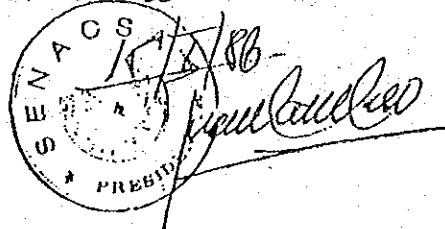
Estimado Dr. Romero:

Tenemos el agrado de informarle que el cultivo traído por el Dr. Brambilla correspondiente a la cabra N° 171 de muestra recolectada el 5 de agosto del presente año en la localidad de TTE. ZENTENO ha sido tipificado como Brucella melitensis biovar 1.

Atentamente,

*Joe R. Held*  
Dr. Joe R. Held  
Director

A la Dirección de Laboratorio  
División de Brucelosis.



6. 人から分離されたブルセラ菌の同定と型別

チャコ地方の牧場の人夫で波状熱、頭痛を訴え、熱帯病研究センター (LACIMET—Laboratorio Central Medicina Enfermedad Tropical) に診断・加療の為来院し、臨床的にブルセラ病と診断され、加療された例である。その際血液培養が試みられ、さらに SDA 培地にブルセラ様菌が出現した為、当該センター細菌部 (JICA 日本人 Expert) より同定、型別の依頼された例である。患者はアレハンドロ・オビエドという名で 61 才の男性でサンタテレサ (チャコ地方) の出身で牧童として働き生牛乳の摂取を習慣としていた。

I.- DATOS DEL PACIENTE :

表 10

NOMBRE : ALEJANDRO OVIEDO  
EDAD : 61 años  
SEXO : Masculino  
FECHA DE INGRESO : 12-X-86.  
DIRECCION : Santa Teresa  
PROFESION : Empleado  
ESTADO CIVIL : Soltero  
PROCEDECENCIA : Santa Teresa (Oruro)  
 Empleado de una estancia en el Oruro, ingiere carne de cabra, agua de algibe o incluso tajamares.

II.- AISLAMIENTO : A partir de sangre, en caldo citratado

Sub-cultivos en EDA y TSA.

RESULTADO : Colonias lisas, transparentes, blanco-amarillentas; 1 ~ 2 mm. 48 hs.

コロニーはスムーズ型

III.- IDENTIFICACION DE LA BACTERIA : 生化学的性状

Coloración de Gram: coccobacilos gram negativos

白黄色 1 ~ 2 mm 1.4.8

hrs 後

MOTILIDAD	REQUER.CO <sub>2</sub>	CATALASA	OXIDASA	O-F	GLUCOSEFER
-	+	-	+	-	-

En 24 hs. ya se observa crecimiento.

IV.- TIPIFICACION :

Ureasa Prod.	H <sub>2</sub> S Producción	Creo. Thion	Creo. Fusina	Monocasp Antisuero M	Lisis por Fagos A	Requer. de suero p/su crec.
+	+	-	+	-	+	-

RESULTADO : Corresponde a Brucella Abortus - Biotipo 1

Brucella abortus

Biotipo 1 と同定

DR. BRIGIDO RIVERA  
 Experto J.A.O.A.-

DR. JULIO RUBEN BRAMBILLA  
 Jefe División Brucelosis

## II 牛キャンピロバクター病、牛トリコモナス病

これらの疾病に関しては、大学獣医学部微生物学研究室にて実施することとした。なお、勤務時間は14:00~18:00である。微生物学教室は古い建物として存在していたが、ここでは細菌学的検査が困難と考え、英国・スイスの基金で建てられたニューカッスル病ワクチン製造棟（久米短期専門家が乳房炎の細菌検索に使用）を本プロジェクトとしての微生物学研究室として、このプロジェクトに供与された微生物学関係の機材の大半（1987年2月に無償供与で建築中の微生物研究室棟が完成予定の為、当面使用する機材について移動）をこの棟に移動した。この棟には馬伝貧研究室も設けられ主にゲル沈にて診断を実施している。この棟は本来ニューカッスル病ワクチン製造用として建築され、それに用いる器具・器材が導入されていたが、まったく作動されることなく、ワクチンも製造されることなく現在に至っているとのことであった。聞くところによれば、国内産鶏卵はワクチン製造に適さなく、SPF卵はブラジルからの輸入によらねばならない上、英国からワクチン製造に係るExpertが来邦し、カウンターパートに技術移転を図ったが、技術移転が成功せず現在まで製造に至らないとのことであった。

さてキャンピロバクター、トリコモナス、ブルセラ等の調査の為の採材は、演習牧場にて実施され、（採材にあたっては、微生物研究室より1名、寄生虫学研究室より1名、筆者と運転手）少なくとも4名にて行なった。ブルセラ材料は血液を採材して、キャンピロバクターについては、雌で腔粘液を凝集試験用にホルマリン加生食にタンポンとともに、また培養用として、チオール培地に粘液を投入する。雄からは包皮腔液を運搬用にBrain Heart infusion Brothに投入、トリコモナスについては雌で腔粘液を後述のドリコモナス用培地に投入、雄からは包皮腔液をBrain Heart infusion Brothに運搬用に投入する。

実験室内検査方法はキャンピロバクターの場合、培養法、蛍光抗体法、腔粘液凝集反応によった。トリコモナスについては、直接鏡検・ギムザ染色法によった。また、キャンピロバクターのF・A（蛍光抗体法）については寄生虫学教室に蛍光顕微鏡が設置されていたので、そこで実施することになった。

### 1. カウンターパート

#### 1) 微生物学研究室

DR. Miguel Angel Almada

DRA. Elena Enciso de Ayala

#### 2) 寄生虫学研究室

DR. Antonio Rodriguez Sanchez

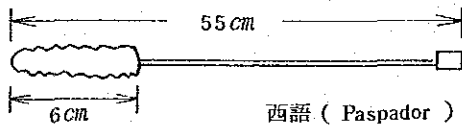
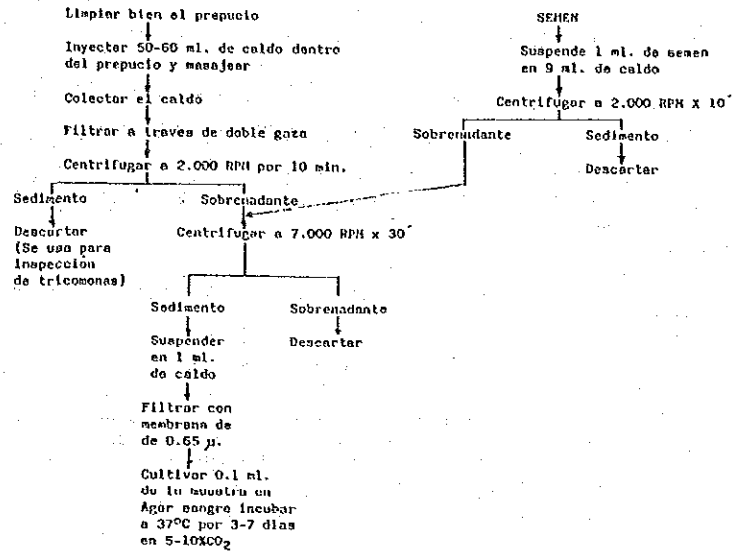
DR. Estila Maciel

## 2. キャンピロバクター・トリコモナスの採材

図8にあるように、雄からの採材は頭初牛用の尿道カニユーレを包皮腔内に入れ、そこへHIブイオンを投入して包皮洗浄液を採材していたが、真ちゅう製のラセン（先端）型の採取器（アルゼンチン製）をパ国内で特注製造し、その後採材はそれによった。

METODO DE COLECCION DE MUESTRAS PARA CAMPILOBACTER

図 8



## 3. キャンピロバクターの培養

CARACTERES DEL CAMPILOBACTER

表 1 1

*1 ICSB (1980)	Catalasa	25°C		*1 42°C		H <sub>2</sub> S	Glic 1%	NaCl 3,5%	B.G.O. 0.1%	NO <sub>2</sub>
		+	-	+	-					
C. Fetus Subpp. Fetus	+	+	-	-	+	+	-	+	-	
C. Fetus subony venerealis	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
C. Jejuni	+	-	+	+/-	+	+	-	-	-	
C. Coli	+	-	+	+/-	+	+	-	+	?	
C. Sputorum Subesp. mucosalis	-	+/-	-	+	+	+/-	+/-	?	+	

Caracteres comunes del Campilobacter: Morfología: curvada; Grana; Motilidad: +, aerobio: -; oxidasa: +; O/F: -; NO<sub>2</sub>: +; Indol: -

\*1 ICSB. Comité Internacional de Bacteriología Sistemática.

\*2 Papel de acetato de plomo.

同定にあたり性状を表11の通りとした。しかし実際分離には成功しなかった。培養は、チオール寒天培地（またはHI寒天）に10%の割合で牛脱繊維血を加え、CO<sub>2</sub>10%、O<sub>2</sub>5%、N<sub>2</sub>85%の混合ガスで4~5日間培養した。



4. キャンピロバクター（腔粘液凝集反応）

この反応は非特異反応が見られる傾向があるので採材にあたり、注意深く粘液の状態をノットすることとした。

方法は図9によった。

TEST DE AGLUTINACION PARA CAMPILODACTER

図9

- 1.- Colecta de mucus vaginal con tampon
- 2.- Introducir el tampon en una solución con formalina al 0.3% (1:10 = mucus por 24 hs.)
- 3.- Dilución

Tubo N <sup>o</sup>	1	2	3	4	5
Salina con Formalina al 0.3%		0,5ml.	0,5	0,5	0,5
Mucus	0,5ml.	0,5	0,5	0,5	0,5 (descartar)
Antígeno	0,5ml.	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilución final	1:2	1:4	1:8	1:16	-

4. Incu. en a 37°C por 20 - 24 hs.
5. Lectura e interpretación (++)

Dilución final	1:2	1:4	1:8	1:16
Negativo	+	-	-	-
Sospechoso	++	+	-	-
Positivo	+++	++	+	-

5. トリコモナスの培養・観察

培養液は表12の通である。

HIブイオンで運んで来た材料はすぐにこの培地に投入し、24 hrsに直接鏡検した。また不明確のものや疑いものについては、継代しギムザ染色を実施し観察した。

表12

CULTIVO DE TRICHOMONAS  
MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO SIN ANTIBIOTICO PARA SUBCULTIVOS:

Extracto de carne	継代用培地	10 gr.
Peptona		10 gr.
Dextrosa		10 gr.
Na Cl		3-5 gr.
Agua destilada / e.s.p.		1000 ml.
		ph 7.2 - 7.4
		+ Suero bovino 10%

初代培地

MEDIO CON ANTIBIOTICO PARA CULTIVO PRIMARIO

Penicilina	500 - 1.000 U.I./ml.
Streptomycin	0.5 - 1 mg/ml
Extracto de carne	3 gr.
Peptona	10 gr.
Dextrosa	10 gr.
Na Cl	1 gr.
Agar	0.7 gr.
Agua destilada c.s.p.	1000 ml.
	ph 7.2 - 7.4
	Suero bovino 10 %

6. 演示牧場における牛ブルセラ病、牛キャンピロバクター病、牛トリコモナス病の検査結果  
(1985.11~1986.10)

ESTANCIA DEMOSTRATIVO	RESULTADO DE ANALISIS DE BRUCELA CAMPYLOBACTER Y TRICHOMONIASIS				
	DOVINO HEMBRA HACHO	TRICHOMONIASIS	CAMPYLOBACTER	BRUCELOSIS POSITIVO SOSPECHOSO	
CORDILLERITA	16	0	0	0	0
	10	0	0	0	1
POZO AZUL	52	3	12	6	3
	47	0	2	6	0
LOMA GUAZU	30	0	0	0	0
	-	-	-	-	-
PINDORA	40	0	0	0	0
	15	0	0	0	0
SANTA CARMEN	4	0	0	0	0
	60	0	0	0	4
BUENA VISTA	30	0	0	0	0
	20	0	0	0	0
PIRIPUCU	29	0	0	0	0
	-	-	-	-	-
CABAÑA GUAVIRAY	-	-	-	-	-
	31	0	0	0	0
CABAÑA EL RINCON	-	0	0	0	0
	11	-	-	-	-

ESTANCIA DEMOSTRATIVO	RESULTADO DE ANALISIS DE BRUCELA CAMPYLOBACTER Y TRICHOMONIASIS				
	BOVINO HEMBRA HACHO	TRICHOMONIASIS	CAMPYLOBACTER	BRUCELOSIS POSITIVO SOSPECHOSO	
ESTANCIA EL RINCON	-	-	-	-	-
	110	3	3	7	1
ESTANCIA BUENA VISTA DE CHIACO	50	0	0	0	0
	116	0	0	1	6
	0	0	0	0	0
TOTAL GENERAL	251	3	12	6	3
	420	3	5	14	12

## 7. プロジェクトサイト内の牧場における検査結果

### ESTABLECIMIENTOS UTILIZADOS PARA TRABAJOS TECNICOS DENTRO DEL PROYECTO

#### RESULTADO DE ANALISIS DE BRUCELA

#### CAMPYLOBACTER Y TRICHOMONIASIS

ESTANCIA	BOVINO		TRICHOMONIASIS	CAMPYLOBACTER	BRUCELOSIS	
	HEMERA	MACHO			POSITIVO	SOSPECHOSO
QUYQUYHO (SENACSA)		13	0	0	0	0
TANBO MODERNO (F.C.V.)	47	-	0	1	0	0
TANBO RUSTICO (F.C.V.)	13	-	0	0	0	0

### ESTABLECIMIENTO UTILIZADOS PARA TRABAJOS TECNICOS FUERA DEL PROYECTO

(プロジェクト外の牧場)

ESTANCIA	BOVINO		TRICHOMONIASIS	CAMPYLOBACTER	BRUCELOSIS	
	VACA	RETA			POSITIVO	SOSPECHOSO
	11	-	-	-	0	0

### Ⅲ その他の疾病 (乳房炎の細菌検索)

1985年11月の中間エバリコエーションにて、ブルセラ病、牛トリコモナス病、牛キャンピロバクター病についての浸潤調査・診断・予防の確立を行なう旨の実行計画を立案されたが、その時に、その他の疾病として乳房炎が入ることとなった。というのも過去に乳房炎の細菌検索ということで短期の久米専門家が来パされ、技術指導され、パ国側でそれらが継続している経緯を踏まえて、その他の疾病の中に入ることとなった。積極的な技術指導及び調査は実施しなかったが、若干の応用を図ることとした。すなわち、今までパ国においては細菌同定に日本からのApiシリーズを使用していたが、高価な為、パ国では将来入取出来ないことなどを考慮し、グラム染色・カタラーゼ・オキシダーゼ・O/F・TSI・SIM等の確認培地や試薬を使いgenusを決定することにした。また、牛乳1mlあたりの細菌数をカウントすることによって乳房炎の程度を知ることとした。尚、今まで通り抗生物質感受性テストは継続されて来た。

少ない資料で全体的な事を言う事が出来なかったが、乳房炎の治療に抗生剤の乱使用の一端をうかがうことが出来た。さらに検査を進め、抗生剤の使用に係る規則を設けることを提案した。

1. 1985.11~1986.5までの細菌検査及び抗生剤の感受性テスト

Nº caso	FECHA	MUESTRA	RAZA	LOCALIDAD	BACTERIAS AISLADAS	TEST DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS				Observación
						H.S	S	L.S	Preistente	
1	22-XI-85	Leche	H	S. Lorenzo	Streptoc.	Fo-	Fb-	Cr-On Dkb	Lkb-Xp-D-Ho-N-F-L-P-T-ST-Dct	1- Fo= Fosfomicina
2	3-XII-85	"	H	"	Stafiloc	Ib-Cr		Dct	Gs-D-Xp-N-Ho-F-L-GT-T-Fo-Cl	2- Ib= Ampicilina
3	4-XII-85	"	H	Villeta	Stafiloc		N-Ho	Cr-On	Fo-Dkb-D-Ho-F-L-P-ST-Xp-Dct	3- Cr= Cepharolidin
4	23-XII-85	"	H	H.R. Alonso	Stafiloc		Ib-N	Ho	On-D-Dkb-F-L-P-ST-Xp-Dct-T-Cr-Fo-Fb	4- Dkb= Dibekacina
5	28-XII-85	"	H	S. Lorenzo	Coryneb.	T-Xp		On	Dkb-Xp-D-Ho-N-F-L-P-ST-Dct-Fb-Fo	5- On= Gentamicina
6	6-I-86	"	H	"	Stafiloc	On	Dct		Xp-Dkb-D-Ho-N-L-P-T-ST-F-Cr-Fo-Fb	6- D= Dulfisomidin
7	10-II-86	"	H	Caplatá	Coryneb		P-T-Cr		Dkb-Xp-D-Ho-N-F-L-Fb-SP-Dct-Fo	7- Ho= Minociclina
8	12-III-86	"	H	Pa. Italla	Stafiloc	On-Fb	Ho-F	D-Dkb	Xp-N-L-P-T-ST-Dct-Fo-Cr	8- H= Novobiocin
9	20-VI-86	"	H	Aregua	Stafiloc		On	T-Dkb	Ho-Xp-N-L-P-ST-D-Dct-F-Fo-Cr-ST	9- F= Furazolidona
10	26-VI-86	"	H	S. Lorenzo	Stafiloc		F-On	T	Ho-Xp-N-L-P-ST-D-Dct-Fo-Cr-ST-Fb	10- L= Lyncomicina
11	2-VII-86	"	P.S	"	Stafiloc		On-L	T-ST-P	Ho-Xp-N-L-ST-D-Dct-Fo-Cr	11- P= Penicilina
12	9-VII-86	"	H	"	Stafiloc	F	On-F	ST	Ho-Xp-N-L-D-Dct-Fo-Cr-Fb-Dkb	12- T= Tetraciclina
13	11-VII-86	"	P.S	"	Streptoc	On			Ho-Xp-N-L-D-Dct-F-Fo-Cr-Fb-Dkb-T-P-ST	13- ST= Streptomycin
										14- Xp= Polymixin-B
										15- Dct= Doxiciclina

抗生剤感受性テストのまとめ

SENSIBILIDAD DE CERMEJES DE LA MASTITIS A LOS ANTIBIOTICOS

	<u>MUY SENSIBLE</u>	<u>SENSIBLE</u>	<u>LEG. SENSIBLE</u>	<u>RESISTENTE</u>
FOSFOMICINA	1			12
AMPICILINA	2	2		9
CEPHAROLIDIN	1	1	2	9
DIBEKACINA			3	10
GENTAMICINA	3	4	3	3
DULFISOMIDIN			1	12
MINOCICLINA		2	1	10
NOVOBIOCIN		2		11
FURAZOLIDONA	1	2		10
LYNCOMICINA		1		12
PENICILINA		2	1	10
TETRACICLINA	1	1	3	8
STREPTOMICINA			2	11
POLYHIXIN B	1			12
POXICICLINA		1	1	11
T. GENERAL	10	18	17	150

2. 細菌同定を確認培地にまた1 mlあたりの細菌数のカウントを開始してからの結果

1986.6~1986.11

N° casos	FECHA	MUESTRA	ESPECIE	TAZA	LOCALIDAD	BACTERIAS AISLADAS	TEST DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS				FLORA BACTERIANA x ml	OBSERVACION
							NOY SENSIBLE	SENSIBLE	LEGER. SENSIBLE	RESISTENTES		
1	17-VII-86	leche	Bovina	H	C. Grande	Ech. coli		T	P	F-Cl-G <sup>3</sup>	1.0x10 <sup>5</sup> /ml	P-Penicilina
2	21-VII-86	"	"	P.S	S. Lorenzo	Ech. Coli	T-F	ST-P-G			9x10 <sup>3</sup> /ml	G-Gentamicina
3	21-VII-86	"	"	H	"	Stafillo	P	T		ST-F-G	5.1x10 <sup>3</sup> /ml	Cl-Clorofenicolina
4	21-VII-86	"	"	H	Capitza	Enterob		T-ST	P-Cl	G	9.8x10 <sup>3</sup> /ml	F-Furazolidona
5	21-VII-86	"	"	H	Ita Encarn.	Enterob		F	P-G	Cl-T	7.7x10 <sup>3</sup> /ml	ST-streptomicina
6	21-VII-86	"	"	H	"	Acinetob	F-T		G	Cl-P	1.7x10 <sup>4</sup> /ml	T-Tetraciclina
7	21-VII-86	"	"	H	"	Acinetob	F-P	ST-G		Cl	8x10 <sup>4</sup> /ml	
8	24-VII-86	"	"	H	Caaguazú	Enterob	T-F	G	ST-P		6.5x10 <sup>7</sup> /ml	
9	11-VIII-86	"	"	H	C. Grande	Stafillo	T			Cl-G-P-ST	9.2x10 <sup>3</sup> /ml	
10	12-VIII-86	"	"	P.S	S. Lorenzo	Stafillo	F-T	G-P		Cl	3x10 <sup>4</sup> /ml	
11	25-VIII-86	"	"	H	"	Stafillo	T	G-ST		Cl-P	3.3x10 <sup>5</sup> /ml	
12	25-VIII-86	"	"	H	Capitza	Strepto		F-G		Cl-FOST	8x10 <sup>5</sup> /ml	
13	9-IX-86	"	"	P.S	Aregua	Micococ	T	F-G		Cl-P	3.2x10 <sup>4</sup> /ml	
14	9-IX-86	"	"	H	S. Lorenzo	Coryneb	T-ST	G		Cl-P	9.3x10 <sup>8</sup> /ml	
15	9-IX-86	"	"	H	"	Micococ	Cl	T-G		P-ST	2.2x10 <sup>4</sup> /ml	
16	12-IX-86	"	"	H	"	Coryneb	G			P-Cl-T-ST	5.6x10 <sup>4</sup> /ml	
17	15-IX-86	"	"	P.S	"	Coryneb		G	Cl	P-ST-F	2.6x10 <sup>5</sup> /ml	
18	15-IX-86	"	"	H	"	Coryneb		T-F-G		P-Cl	2.9x10 <sup>7</sup> /ml	
19	25-IX-86	"	"	H	"	Lactobac		P-T		Cl-F-G	1.3x10 <sup>5</sup> /ml	
20	25-IX-86	"	"	P.S	"	Stafillo	T	ST		P-Cl-F	1.9x10 <sup>6</sup> /ml	
21	30-IX-86	"	"	H	"	Coryneb		F-G		Cl-P-T	4.2x10 <sup>3</sup> /ml	
22	30-IX-86	"	"	P.S	"	Micococ	F	G		T-Cl-P	2.1x10 <sup>3</sup> /ml	
23	1-X-86	"	"	P.S	"	Acinetob	F	T	G	Cl-P	1.1x10 <sup>6</sup> /ml	
24	9-X-86	"	"	H	"	Micococ	Cl	T	G	P-F	2.2x10 <sup>5</sup> /ml	

抗生剤感受性テストのまとめ

SENSIBILIDAD DE GERMEES DE LA MASTITIS A LOS ANTIBIOTICOS

	<u>NOY SENSIBLE</u>	<u>SENSIBLE</u>	<u>LEGER. SENSIBLE</u>	<u>RESISTENTE</u>
TETRACICLINA	9	8	-	4
FURAZOLIDONA	7	5	-	6
PENICILINA	2	3	4	15
CLOROFENICOLINA	2	-	2	17
GENTAMICINA	1	13	4	5
STREPTOMICINA	1	5	1	6
T. GENERAL	22	34	11	53

#### Ⅳ 大学微生物学研究室でのその他の実施事項

これらの事項については、直接本プロジェクトと関係はないがプロジェクトを遂行するにあたり、カウンターパートの家畜衛生上の技術の向上が必要であった為、各種実験を行なった。

尚、これらの詳細については、ここでは省略することとするが、パ国側にはカウンターパートから西語で報告された。

これらの実験は、プロジェクト外の仕事ではあったがパ国側に impact を与えることが出来た。

以下、題目のみ例記する。

1. 馬インフルエンザの抗体調査（HI-マイクロトレイ法）
2. 馬パラチフスの抗体調査（試験管凝集反応）
3. 馬伝染性貧血ゲル内沈降反応における非特異的反応の除去について
4. レプトスピラ症のスクリーニングテストについて（ラテックス抗原を使用した血清凝集反応）
5. ニューカッスル病・M・ガリセプチカムとS・プロラム等の抗体調査（ニューカッスル、HIマイクロトレイ法、M・ガリセプチカム、平板凝集反応、S・プロラム、平板凝集反応）
6. 牛からのクロストリジウムSPPの分離について

#### Ⅴ 家畜衛生全般について

このことについては、短期専門家として来パされた農水省家畜衛生試験場伊佐山康郎先生が詳細に報告されている（パラグアイ家畜繁殖改善計画総合報告書I、農開畜・JR・85-1）ので省略するが、農牧省家畜衛生センターについてふれてないので若干報告する。

正式名は、農牧省獣医診断調査ラボラトリー（Laboratorio de Investigacion y Diagnostico Veterinario LIDIAV）と言う。（日本語では農牧省家畜衛生センターと訳すのが適すると思うので以下この様に呼ぶこととする）アスンシオン大学獣医学部のルートをへだてて、真向いに位置し、農牧省農牧普及局の建物の半分を使用している。1972年に英国の援助で設立され、以来10年間英国よりExpertの来パ、機材供与をされている。SENACSA セナクサは、パ国における法定伝染病である口蹄疫、ブルセラ病、狂犬病、結核の4疾病について、法に基づき運営・機能していて独立機関であるのに対し、このセンターは、農牧省の機関でその他地方に2つのラボを有している。機能は法定伝染病以外のすべて疾病に対する診断・予防また、それらの改善を目的としている。（狂犬病・ブルセラについては当センターでも診断を行なっている。）

機材は大抵英国の機材が入っており、パ国側からも英国に研修に出ている。また1979年からアフリカ豚コレラの診断・予防の目的でF・A・Oより、ウイルス病に係る機材供与を受け、

F・A・O Expert が来パしており、パ国側よりもスペイン国にある F・A・O アフリカ豚コレラ研究所に研修に出ている。

現在英国は細菌学の Expert を 1 名派遣しているだけで、器具機材の供与はしてない。それにかわり西独が 3 年前から、このセンターを中心に機材供与、Expert の派遣をし、現在に至っている。西独はパ国のパラグアリ県に的をしぼり、この県の家畜衛生全般にわたり、調査を実施している。なお、ウイルス部門の F・A・O からの援助が続いている。

研究室はウイルス、ブルセラ、血液、狂犬病、細菌、生化学、寄生虫等の 7 部門に分けられており、ウイルス部門は別棟で独立しているが、他は同一棟にそれぞれ独立した研究室を有している。各研究室のチーフは英国（ウェイブリッジ獣医学研究所）スペイン（F・A・O アフリカ豚コレラ研究所）・米国（プラムアイランド）等留学し、かなりの知識を有している。3 年ごとの報告書を作成しており、各研究室スタッフ原著（英国）の論文も多くある。セナクサ、大学と比較すれば、セナクサの口蹄疫、ブルセラを除けば技術的には数段上であろうと推量出来る。ここもセクショナリズムの国で、大学とセナクサは人間交流を持っているが、当センターとセナクサ・大学とは、人間交流はおろか、まったく交流がないのが実情である。

農牧省家畜衛生局は、セナクサが法定伝染病である 4 疾病に対して国家プログラムを有しているのに対し、ニューカッスル病、馬伝染性貧血、豚コレラの三つの国家プログラムを有し、その診断・予防に対し法・規則を有しているので、当センターがその診断のかなめとなっている。聞くとところによると馬伝貧ゲル沈抗原が中米開発機構の援助で第 1 ロットを作成したと新聞に報道されていた。豚コレラのワクチンは台湾の技術援助で大学獣医学部に場所をかりて、クリスタルバイオレット不活化ワクチンを製造している。ND ワクチンについては大学獣医学部に英国が技術援助を実施したが成功しなかった。

## おわりに

今回のパ国派遣にあたり、御配慮頂いた動物検疫所白下登前所長、間邦彦所長、動物検疫所神戸支所倉野猛前支所長、田中賢一郎支所長並びに支所職員の皆様、動物検疫所大阪出張所所有村明出張所長はじめ出張所職員の皆様方には、たいへんお世話になり深謝致します。

JICA 畜開課小野前課長、栗城課長、水野隆氏等、諸手続きに対して感謝申し上げます。

パ国にあっては、調整員小林一三氏、畜産試験場小島敏之氏、帯広畜大高橋潤一氏、受精卵移殖の専門家遠藤氏等本プロジェクトのメンバーの皆様、並びにアスンシオン大学獣医学部長 Dr. Eduardo Ruiz Almada, セナクサ所長 Dr. Juan Pablo Romero はじめ、セナクサ、学部の Dres. Dras の皆様には公私ともにお世話になり感謝申し上げます。

CEPANZO / WHO 訪門にあたり所長の Dr. Joel R. Held に対し厚く御礼申し上げます。

私は技術協力ということでパ国に滞在したわけですが、南米の畜産形態、牛の狂犬病等、日本

では見ることの出来ない経験をさせていただき、私自身の勉強になりました。これ等の貴重な経験を動物検疫所の一家畜防疫官として、生かせることを願っております。

また日本より本プロジェクトを支援し、また来日するパ国側カウンターパートの手助けが出来ればと思っております。

また何時の日か来パすることを希望しつつ、パ国の皆様の御健康と御活躍をお祈りします。



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCION  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE DIAGNOSTICO LABORATORIAL DE ENFERMEDADES  
EN DIFERENTES ESPECIES

RECOPILACION: DR. SHIGEO NISHINO

PROYECTO DE MEJORAMIENTO DE LA REPRODUCCION ANIMAL

J. I. C. A. AÑO 1.986

## PREFACIO

El folleto contiene las diferentes técnicas y procedimientos, que fueron utilizadas dentro y fuera del Proyecto de Mejoramiento de la Reproducción Animal, en los laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y de Brucelosis del Servicio Nacional de Salud Animal.

El folleto contiene una descripción pormenorizada sobre los diferentes procedimientos que se deben realizar en cada técnica con el fin de facilitar su aplicación, que por lo general no vienen detallados en los textos técnicos.

Las técnicas utilizadas fueron seleccionadas en base a su practicidad y efectividad que fueron comprobados en los laboratorios de cuarentena animal del Japón, esperando que con la práctica y las investigaciones realizadas por los técnicos paraguayos, sean ajustados o cambiados detalles, de modo que sean dichas técnicas aún más efectivas y que puedan ser aplicadas en el Paraguay.

Quiero expresar mis sinceros agradecimientos tanto al Prof. Dr. Eduardo Ruiz Almada, Decano de la F.C.V. como al Prof. Dr. Juan Pablo Romero, Presidente de SENACSA por la colaboración brindada para realizar todos mis trabajos a lo largo de mi estadía en Paraguay.

También quiero agradecer al Dr. Rubén Brambilla, a la Dra. Nelly Ortíz a la Dra. Elena Enciso y al Dr. Miguel Almada por haberme ayudado en la traducción de mi trabajo, puesto que el original lo he escrito en inglés, y a la Señorita Silva por haberlo mecanografiado.

Noviembre de 1.986

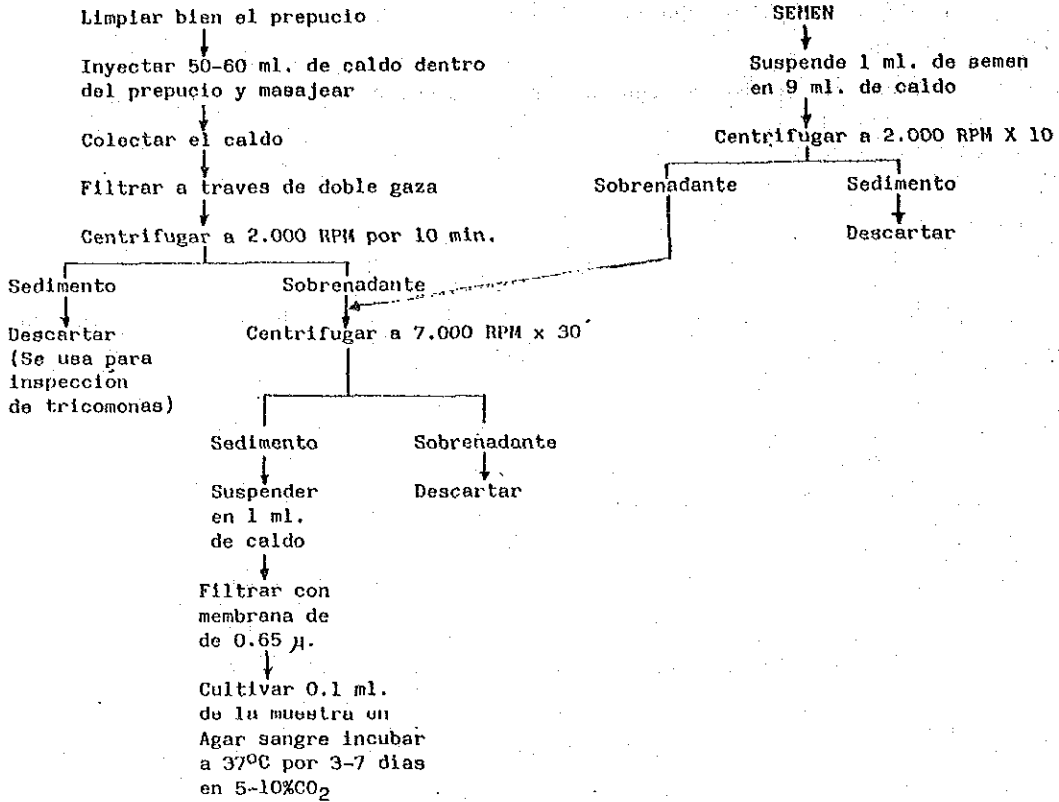
San Lorenzo, Paraguay

## CONTENIDOS

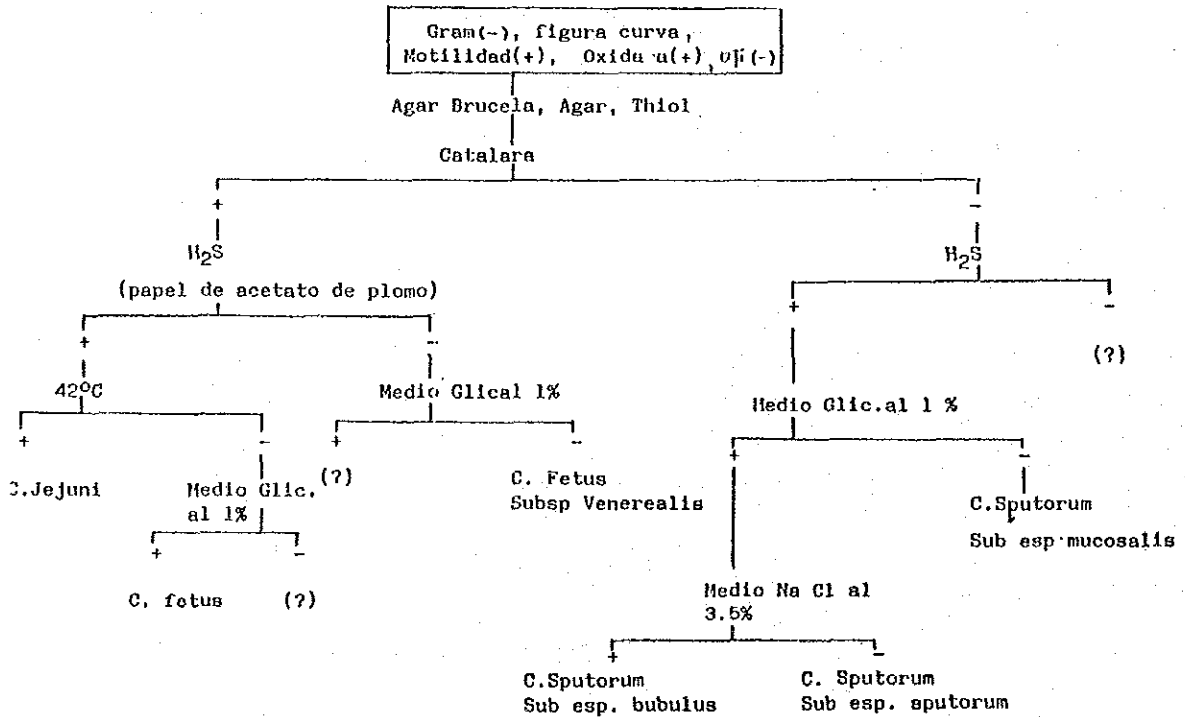
- Método de colección de muestras para Campylobacter (P.1)
- Manual de identificación de Campylobacter (P.1)
- Caracteres del Campylobacter (P.2)
- Test de Aglutinación para Campylobacter (P.2)
- Tratamiento de Campylobacteriosis en toros (P.3)
- Tratamiento de la Trichomoniasis (P.3)
- Método de aislamiento de Leptospira (P.3)
- Procedimiento para la reacción de Ascoci (P.4)
- Diferenciación entre Bacilo Anthraealis y B.cereus. (P. 5)
- Procedimiento para el diagnóstico de Anthrasis (P. 5)
- La reacción en cordon de Perlas (P. 6)
- Identificación de B. Anthrasis por medio de la prueba del Fago (P.7)
- Leucosis Bovina (P.8 - 10 )
- Antígeno en Gel para inmuno difusión para el diagnóstico de Leucosis Bovina (P.11 - 12 )
- Medio de Korthof (P.13 )
- Test de Aglutinación para Leptospira (P. 13)
- Antígeno para detección de Leptospiras (P. 14 )
- Medio de cultivo para leptospirosis (P.15)
- Antígeno de Tuberculinización y John (P.16 )

- Observación de Trichomonas en el microscopio (P. 17 )
- Cultivo de Trichomonas (P. 18 )
- Coloración de Gram y preparación de otros colorantes (P.19.- 20 )

METODO DE COLECCION DE MUESTRAS PARA CAMPYLOBACTER



MANUAL DE IDENTIFICACION DE CAMPYLOBACTER



CARACTERES DEL CAMPILOBACTER

*1 ICSB (1980)	Catalasa	25°C	42°C	H <sub>2</sub> S	*1 H <sub>2</sub> S	Glic 1%	NaCl 3,5%	B.GØ.01%	NO <sub>2</sub>
C. Fetus Subpp. Fetus	+	+	-	-	+	+	-	+	-
C. Fetus subsp. venerealis	+	+	-	-	-	-	-	+	-
C. Jejuni	+	-	+	+/-	+	+	-	-	-
C. Coli	+	-	+	+/-	+	+	-	+	?
C. Sputorum Subesp. mucosalis	-	+/-	-	+	+	+/-	+/-	?	+

Caracteres comunes del Campilobacter: Morfología: curvada; Gram; Motilidad: +, aerobio :-; oxidasa: +; O/F: -; NO<sub>3</sub>: +; Indol: -

1\* ICSB. Comité Internacional de Bacteriología Sistemática.

2\* Papel de acetato de plomo.

TEST DE AGLUTINACION PARA CAMPILOBACTER

1.- Colecta de mucus vaginal con tampon

2.- Introducir el tampon en una solución con formalina al 0.3% (1:10 = mucus por 24 hs.)

3.- Dilución

Tubo N <sup>o</sup>	1	2	3	4	C
Salina con Formalina al 0.3%		0,5ml.	0,5	0,5	0,5
Mucus	0,5ml.	0,5	0,5	0,5	0,5 (descartar)
Antígeno	0,5ml.	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilución final	1:2	1:4	1:8	1:16	-

4. Incubar a 37°C por 20 - 24 hs.

5. Lectura e interpretación (++)

Dilución final	1:2	1:4	1:8	1:16
Negativo	+	-	-	-
Sospechoso	++	+	-	-
Positivo	++++	++	+	-

### TRATAMIENTO DE CAMPILOBACTERIOSIS EN TOROS

1. Lavar alrededor del prepucio con una solución desinfectante.
2. Lavar dentro del prepucio con 2.000 ml. de solución salina
3. Preparar 2 gr. de Streptomina en 10 ml. de agua destilada, e inyectar dentro del prepucio.
4. Inyectar 1.000.000 U. de penicilina y 5 gr. de Strptomina en 100 ml. de aceite de oliva, dentro del prepucio.
5. Preparar 25 gr. de streptomina en 80 ml. de agua destilada, e inyectarlo vía intramuscular.
6. Detectar Campilobacter fetus en el prepucio o el semen.  
Repetir 3 veces.

### TRATAMIENTO DE LA TRICHOMONIASIS

#### 1. Toro

- 1) Inyectar 50 ml. de jabón antiséptico al 0.5 - 1.0 % (en agua) dentro del prepucio y masajear.
- 2) Inyectar 10 - 20 ml. de Solución Lugol Glicerinado ( I : 1 gr, KI : 2 gr.; agua dest: 300 ml.; Glicerina: 300 ml.) dentro del prepucio y masajear.  
Repetir durante 5 - 10 días

#### 2. Vacas

Inyectar solución Lugol - glicerinado dentro del útero  
Repetir varias veces

### METODO DE AISLAMIENTO DE LEPTOSPIRA

- 1.- Orina 100 ml. --- Centrifugar a 3.000 RPM durante 10 min.
- 2.- Sedimento --- Suspender en 5 ml. de salina - muestra
- 3.- Inocular 0.5 ml. de la muestra en la cavidad abdominal de cobayo
- 4.- Observar durante 3 - 15 días (T: 40°C, enflaquecimiento, muerte)
- 5.- Tomar muestra de sangre del corazón.
- 6.- Observar al microscopio (15 x 10 ; iluminación campo oscuro)
- 7.- Muestras de sangre se cultivan en Medio de KORTHOFF.

PROCEDIMIENTO PARA LA REACCION DE ASCOLI

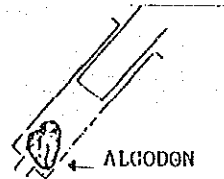
1.- Muestra

- Sangre
- Bazo
- Hígado
- Piel
- Hueso tibia

2.- Se utiliza la solución salina 0,85 %, para mezclar con el bazo, hígado y piel en forma molida. La proporción de la mezcla entre la muestra y la solución debe ser de 1:10. En caso del hueso se introduce la solución dentro del canal medular.

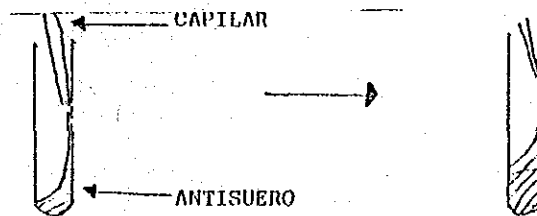
3.- Cada frasco con la muestra se lleva a baño Maria a 100° C por 10 minutos.

4.- Luego se realiza la filtración por medio de una geringa en cuyo fondo lleva una porción de algodón.



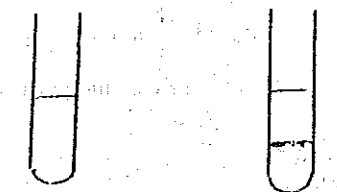
5.- El filtrado se introduce en un tubito por medio de una pipeta Pasteur lentamente por las paredes, el tubito contiene en su interior anti-suero de Bacilo Antracis en una porción de 5 mm., debe haber partes iguales del filtrado y anti-suero.

Las medidas del tubito son: 4 cm de altura y 5 mm de diámetro.



6.- LECTURA

Se verá luego de algunos minutos una línea en forma de anillo en caso que sea positivo entre el filtrado y el anti-suero.



NEGATIVO

POSITIVO



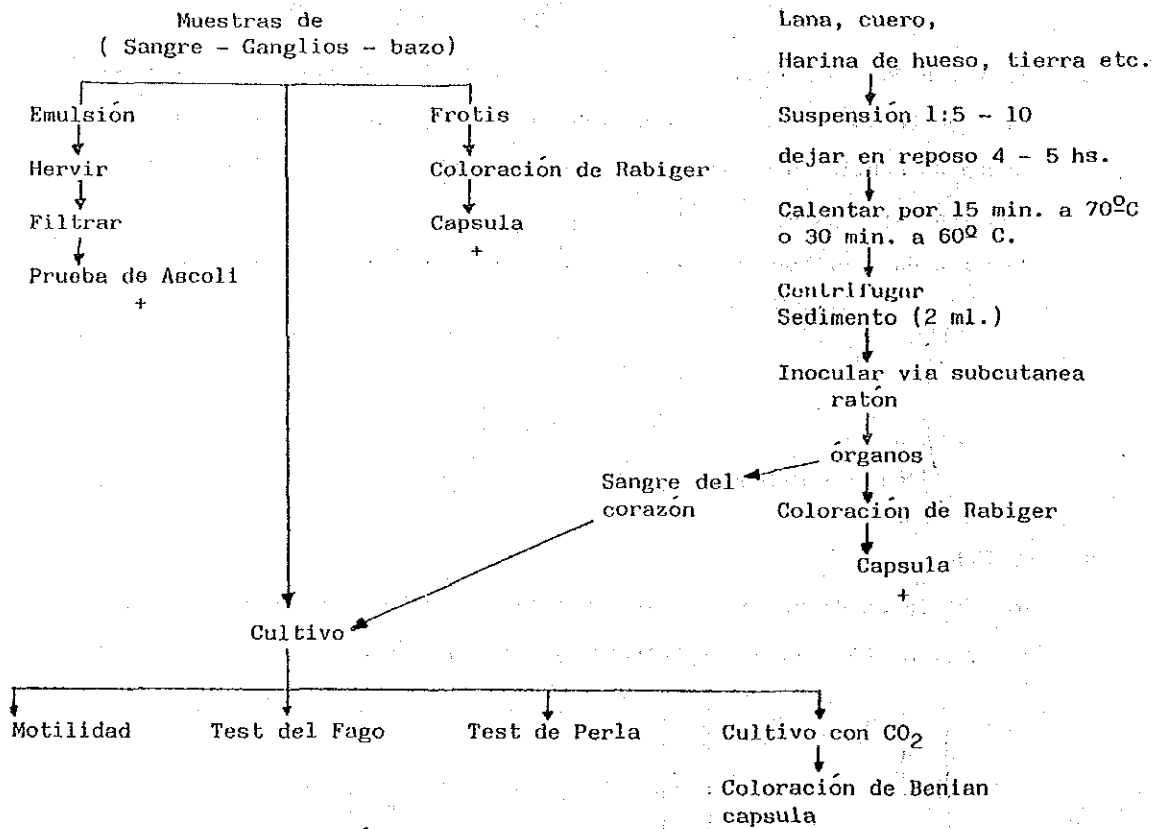
BACILO GEREUS

Este germen saprofito muy difundido en ocasiones es capaz de infectar la ubre de bovinos y producir una aguda y a veces fatal mastitis gangrenosa. El aislamiento debe intentarse durante la fase aguda de la enfermedad; porque el organismo puede estar ausente en muestras tomadas tardiamente.

DIFERENCIACION ENTRE BACILO ANTHRAXIS Y B GEREUS

	B. ANTHRAXIS	B. GEREUS
Motilidad	-	+ (usualmente)
Capsulación	+	-
Salicina (acido)	lento o nada	rapido
Reducción de Azul de Metileno	lento	rapido
Hidrolisis de Gelatina	lento	rapido
Tornasol de leche	coagula, peptoniza lentamente	coagula y peptoniza rapidamente
Hemolisis	nada o muy debilmente	con frecuencia marcadamente hemolitico
Penicilina	sensible	no sensible

PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNOSTICO

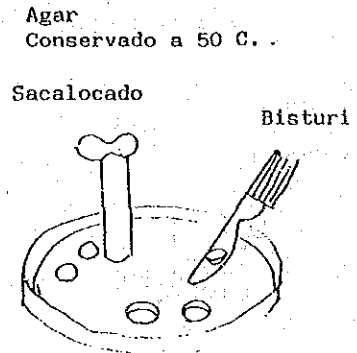
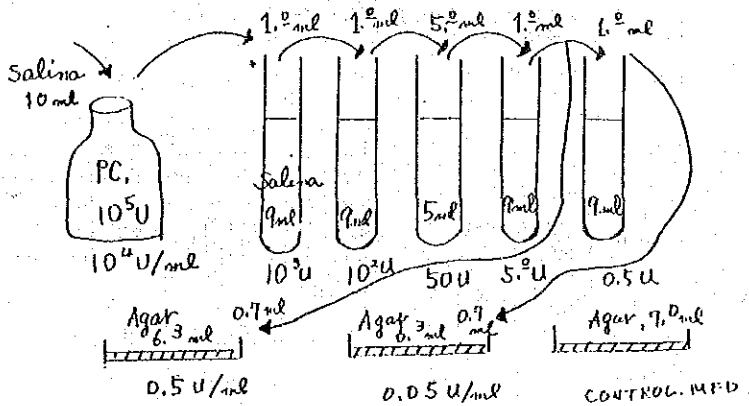


Procedimiento para el diagnóstico de Antrax

LA REACCION EN CORDON DE PERLAS PARA LA IDENTIFICACION DEL BACILO ANTHRACIS

El B. Anthracis varia desde una forma alargada, redonda; forma celular (parecido a perl en la fase inicial de crecimiento sobre agar conteniendo baja concentraci3n de penicilin Mientras que otros organismos antracoides no muestran tales cambios

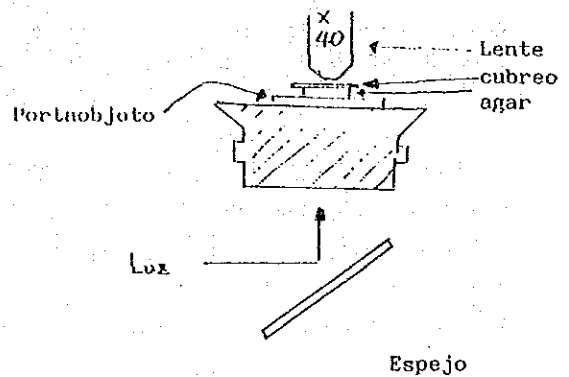
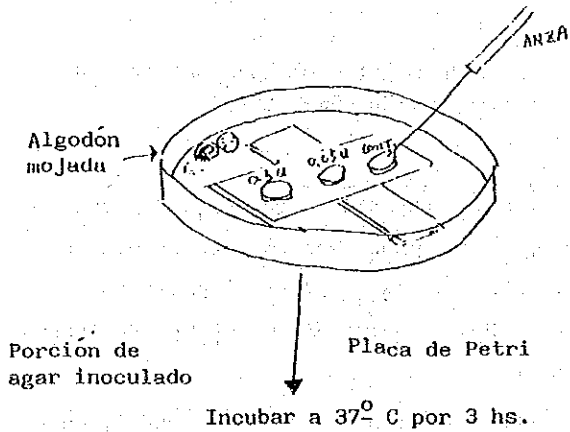
PREPARACION DE AGAR PENICILINA



Sacar la porci3n de Agar perforada en forma redonda

INOCULACION

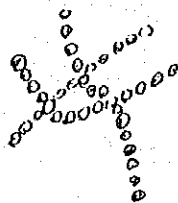
Cepa aislada (incubado en caldo por 3 horas antes de examinar) o Emulsi3n fresca



OBSERVACION:

El cubrelamina es colocado sobre cada porci3n del agar y se observa con objetivo de alto aumento (x180 - 400) seco.

POSITIVO



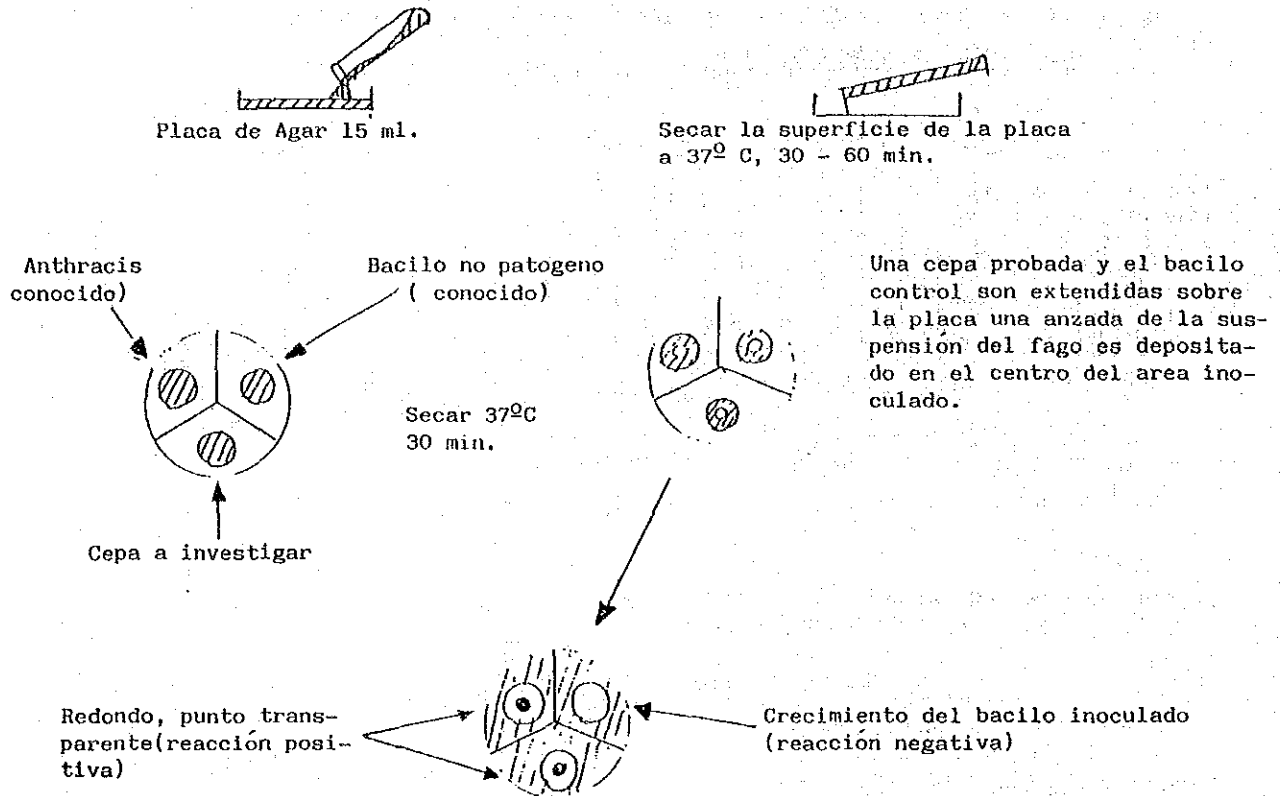
NEGATIVO



	0.5U	0.05 U.	CONT
B. Anthracis	+	+	-
Organismos Antracoides	-	-	-

IDENTIFICACION DE B. ANTHRACIS

FAGO ( BROWN, ER, ET AL., J. BACT. 75,49509 1958)



Lectura: Después de 3 hs. de incubación; los bacilos extendidos, creceran debilmente sobre la superficie del agar; si alguna zona transparente puede ser encontrado dentro del area inoculado; con excepción del bacilo control, muestra una lisis ispecífica y reacción positiva. La placa de agar se deberia, dejar hasta el día siguiente en reposo, la reacción positiva aparecera en forma más notoria.

Nota: La suspensión del Fago puede ser usado durante 1 año; conservandolo a 4° C, pero B. Anthracis; Cepa Davis (no patogenica y sin formación de esporas) deben ser conservados en forma biofilizada.

## LEUCOSIS BOVINA

### (I) INVESTIGACION EPIDEMIOLOGICA.

#### (Leucosis Enzoótica Bovina)

Se sospecha de esta enfermedad en los sgtes casos.

- 1.- Cuando la enfermedad ataca a terneros de mas de 3 años de edad, con un elevado porcentaje de anticuerpos.
- 2.- Si hubo ocurrencia de la enfermedad en epoca anteriores, en el mismo establecimiento.
- 3.- En animales cuya madres han padecido de la enfermedad.
- 4.- Si hubo introducción en el hato de animales tridos de áreas contaminadas..

#### (Leucosis Esporádica)

- 1.- Tipo Tercero: ataca a los terneros de 6 meses, 1 año de edad.
  - Tipo Adolescencia Tímica: ataca a los terneros de 1 año a 3 años de edad.
  - Tipo Cutáneo: ataca a terneros de 1 año a 3 años de edad.
- 2.- Estos animales no presentan formaciones de anticuerpos de esta enfermedad.

### (II) INSPECCION CLINICA

- 1.- Síntoma general: alteraciones del estado general del animal.
- 2.- Terneros (de menos de 1 años de edad): con los ganglios linfáticos hipertrofiados o adenomegalia, generalmente simétrico.
- 3.- Ganglios superficiales hipertrofiados así como los ganglios de los órganos abdominales.
- 4.- Se observa Exoftalmia por la presencia de formaciones tumorales detras del globo ocular, o espacio conjuntivo retro-orbitario.
- 5.- También se encuentran formaciones tumorales a nivel de la nuca , ganglios cervicales (tipo adolescencia tímica)
- 6.- Se producen raciones o lesiones cutáneas, es decir infiltraciones leucémica de la dermis, especialmente en la piel del cuello, dorso y piernas., esta regiones de aspecto papuloso se transforman en nodulos cerrados depilados y escamoso. Esta regiones cutánea tienen evolución lenta.(y so acompañada a veces de formaciones tumorales (tipo cutáneo).
- 7.- Edema de papada: (tipo adolescencia tímica)

### (III) ANALISIS DE SANGRE

- 1.- Aumento de la cantidad de leucócitos, a más de  $10.000/\text{mm}^3$ .
- 2.- En la mayoría de los casos se encuentran leucositos de forma aberrantes es decir de formaciones celulares, las cuales se pueden observar en un 5% del total de leucositos.

### (IV) BIOPSIA:

- 1.- Se observan célula cancerosas.

### (V) AUTOPSIA:

#### (ENZOOTICA)

- 1.- Hipertrofia de los ganglios.
- 2.- Formaciones tumorales en el corazón, mucosa uterina y en el espacio conjuntivo retro- orbital.

3.- Esplenomegalia y también formaciones tumorales localizados en los ureteres.  
(ESPORADICA)

1.- Tipo ternero: Ganglios linfático hipertrofiado generalmente simétrico y distribuido en todo el cuerpo .

2.- Tipo adolescencia Tímica: Hipertrofia ganglionares especialmente alrededor del timo .

3.- Tipo cutáneo : Se observa lesiones granulomatoso .

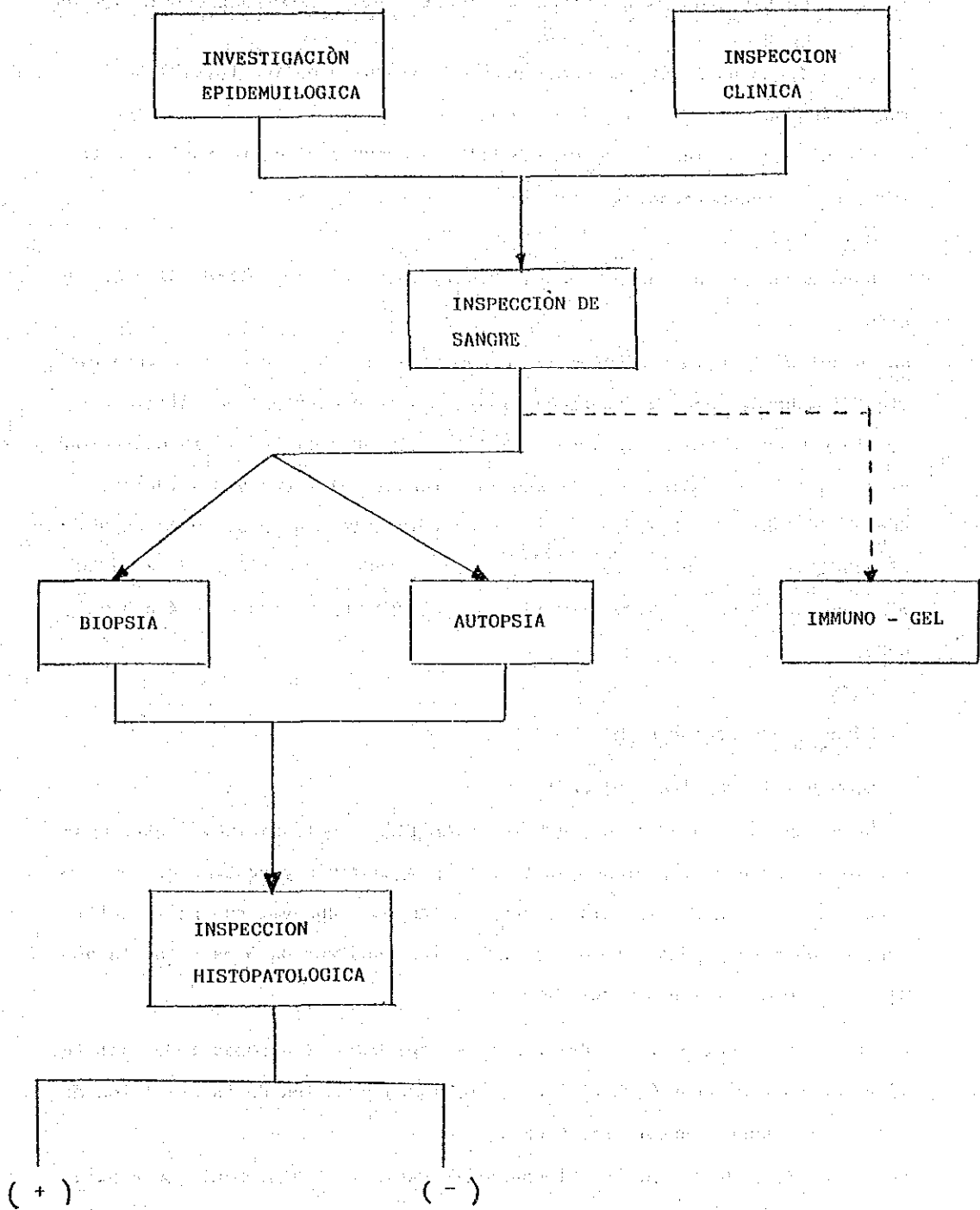
(VI) EXAMEN SEROLOGICO :

1.- Immunodifusión en Gel:

Antígeno: g.p. de virus de leucosis bovina, es usada para la prueba de inmunodifusión y las reacciones son generalmente Positivas en el tipo Enzootico y negativas en el Tipo Esporádica.

METODO DE GÖTZE : PARA DIAGNOSTICO DE LA LEUCOSIS BOVINA

	I GLOBULOS BLANCOS /mm <sup>3</sup>	II LYNFOCITO PORCENTAJE	
Más de 3 años	10.000	60 % >	Normal
	10.000 - 18.000	60 - 75 %	Sospechoso
	18.000	75 % <	Positivo
Menos de 3 años	12.000	65 % >	Normal
	12.000 - 18.000	65 - 75 %	Sospechoso
	18.000	75 % <	Positivo



## ANTIGENO EN GEL PARA IMMUNO DIFUSION PARA EL DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS BOVINA

El antígeno para detectar anticuerpo de leucosis bovina (B.L.V) en inmuno difusión.

El anticuerpo tiene un color amarillento suave y el suero indicador es incoloro y transparente.

### OBJETIVO

Para detectar anticuerpo contra (B.L.V) (Síntesis del método de producción).

Antígeno: se inocula a células F.L.K con virus B.L.V., luego se extrae el líquido sobremadente que contiene el virus y se concentra con Sulfato de Amonio y PEG # 6000, se le agrega NaN3 al 0,1% para evitar la fermentación. Al encontrar se consigue que llegue la potencia del virus a 8 unidades.

Suero: Se inocula B.L.V. concentrado con adyuvante a ovinos, luego se extrae el suero de los ovinos inoculados, el que se inactiva a 56° C. durante 30 minutos, se le agrega NaN3 al 0,1% y se obtiene una potencia de 4 a 8 unidades.

### METODO

#### 1. Método para preparar gel

0.05 M Tris-HCL (PH 7.2) (buffer)

Se agrega 0.85 g NaCl, 0.1 g NaN3, 0.8g (Agar noble DIFICO), total debe dar 100ml. para diluir el gel se coloca en agua tibia y se toma con una pipeta 5 ml del gel y se coloca sobre la lámina y una vez que se solidifique, se perfora el diámetro de los orificios debe ser de 5 mm y la distancia entre orificios deben ser de 3 mm.

2. Se coloca en el orificio del centro el Ag: 0,05 ml a ambos lados del Ag, vá el suero indicador 0,05 ml (ver el gráfico) y en los demás orificios se colocan los sueros problemas, 0,05 ml.

La lámina cargada se incuba a temperatura ambiente (15 a 25°C) sobre base horizontal durante 48 horas, en un ambiente húmedo.

3. La lectura: (1) Positivo: cuando se forman dos líneas de precipitación, una con el suero positivo en Ag y la otra con el suero problema, las líneas deben estar bien unidas, sin entrecruzarse (ver figura)

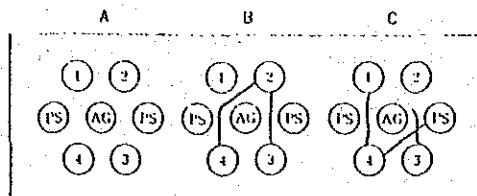
(2) Negativo: la línea de precipitación se forma solamente entre el Ag y el suero Positivo (testigo) y debe diverguer hacia afuera. (ver figura)

(3) Sospechoso: Ni de (1) ni de (2) con sospechosos.

FIG. A      AG: Antígeno      PS: Suero indicador  
              1 , 2 , 3 , 4 .....      Suero Problema

Fig. B.      Ejemplo      1 .... Positivo  
    2, 3, 4 .....Negativo

Fig. C.      Ejemplo      1 , 2 .....Sospechosos  
    3 .....Negativo (no específico)  
    4 .....Negativo



- Observación:
- 1 La muestra se debe inactivar a 56° C 30 minutos.
  - 2 El Ag. no se encuentra inactivado, por lo cual todos los materiales que se utilizan deben ser bien esterilizados.



MEDIO DE KORTHOF

BASE

Peptona blanca	0.8 gr.
NaCl	1.4 gr.
NaHCO <sub>3</sub>	0.02 gr.
KCl	0.04 gr.
Ca Cl <sub>2</sub>	0.04 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 gr.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.8 gr.
Agua destilada	1.000 gr.

Observación:

- 1.- Calentar a 100°C por 40 min. (PH 7.2 - 7.4)
- 2.- Filtrar a través de papel de filtro
- 3.- Autoclavar a 121 °C por 15 min.
- 4.- Guardar a 4 °C
- 5.- Para usar; agregar suero de conejo al 10% (inactivado a 56°C por 30 min.)  
al medio base.

TEST DE LISIS-AGLUTINACION PARA LEPTOSPIRA

1. dilución del suero en tubo

Dilución	1:50	1:200	1:800
KORTHOF Base (o PBS-)	2.5ml.	1.5ml.	1.5ml.
Suero	0.05ml	0.5ml	0.5ml

2. Colocar 0.05ml de cada dilución en medio base de Korthop(o PBS) como control y verterlo en microplacas perforada.
3. Colocar 0.05ml. de antígeno (suspensión de cultivo) en cada agujero de la microplaca.
4. Cubrir la microplaca y mezclarlo en un agitador de microplaca.
5. Incubar a 37°C durante 3 - 4 hs.
6. Dejar una noche a 4°C.
7. Observar al microscopio (15 x 10, iluminación campo oscuro)

TEST DE LISIS - AGLUTINACION PARA LEPTOSPIRA

OBSERVACION

1. Antígeno
  - a. El cultivo se incuba a 30°C por 3 días
  - b. Diluir aproximadamente 300 veces para un campo de microscopio (15 x 10)
2. Lectura e interpretación

0 - 25 % decreciente	-
25 - 50	+
50 - 75	++
75	+++

Grado de positividad

Dilución final del suero

1 : 400 --- ++ = Positivo

## ANTIGENO PARA DETECCION DE LEPTOSPIRAS

Cada una de las Leptospiras están inactivadas con polietilen-latex adicional y le da además una característica opaca en los diagnósticos serológicos.

Tenemos 5 serotipos de Leptospiras que son:

- 1.- Leptospira Interrogans serovar Isterohemorrhagica
- 2.- " " " Autumnalis
- 3.- " " " Heddomadis
- 4.- " " " Australis
- 5.- " " " Canícola

Cada leptospira se reproduce y se agrupan en colonias en placas de KORTOFF (medio de cultivo puro).

Con la adición de formalina se puede inactivar las leptospiras, luego se hace un lavado y se suspende en un medio alcalino con PH: 8.2 NaCl 0,85 % bufferado con glicina. Para no fermentar adicionar 0.1 %  $\text{NaN}_3$

### METODOS

- 0 - Muestra de Suero: se inactivan a  $50^{\circ}\text{C}$  X 30' mezclando 1 ml. suero y 9 ml. sol. salina.
- 0 - Screening test: Prueba Tamiz
- 1.- Se utilizan 10 tubitos de vidrio para 5 series de 2 c/u.
- 2.- De cada serie en 1 tubo se pone 0.25 ml. de suero diluido y en otro 0.25 solución salina para control de transparencia.
- 3.- De cada serie de 2 tubitos se ponen 0.25 ml. de antígeno de cada serovar de Leptospira, bien mezclado con 0.25 ml. de suero diluido.
- 4.- Luego se pone en baño María  $50^{\circ}\text{C}$  x 2 Hs. y después se centrifuga a 2000 RPM x 5'
- 4.- También se puede mantener en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por una noche, sin centrifugar.
- 5.- Lectura: Antes de leer se agita cada tubo, se verá el antígeno sedimentado en suspensión - si aglutina bien a la vista es positivo.
- 6.- El control deberá ser negativo y no se debe encontrar aglutinación y debe ser la suspensión uniforme.

Planificación: TANBO RUSTICO/ 0.5 P.Vx0

Tuberculinización y Jhon

El Martes por la tarde. Se hará en 13 vacas a las cuales ya se ha echo la prueba de Trichomonas, Campilobacteriosis y Brucelosis; cuyos resultados fueron:

Trichomonas: (-)

Brucelosis: (-)

Campilobacteriosis: (-)

Antígeno: Tipo Bovino T. Humano se cultiban y se filtra luego se concentra y este concentrado es lo que se inocular intradérmica.

Características: Microbacterium Tuberculina se cultivá en Medio Thoton, luego se esteriliza a 100° durante 2 horas se centrifuga, luego se separa la parte no sedimentada, y la sedimentada se desecha (bacterias) la parte no sedimentada se filtra y se agrega Fenol 0.5 Pes/Vol/Porcentaje como debe ser agregada Fenol 0.5 P.V/porc. esto se hace para alcanzar la potencia de la Tuberculina.

Método: 0.1 ml se inocular intradérmica 72 hs después se hace la lectura.

Lectura: Tumor más de 5 ml (Tumor duro +)

Tumor menos 3 ml sin tumor duro (-)

Enfermedad de John

Paratuberculosis: La paratuberculosis se cultiva y se filtra luego se concentra y este concentrado es lo que se inocular intradérmica.

Característica: La Paratuberculosis se cultivan en Medio de Dolset, luego se esteriliza a 100° C d/2horas, se centrifuga luego se separa la parte no sedimentada, la sedimentada se desecha, la parte no sedimentada se filtra y se le agrega el fenol como debe ser 0.5 Fenol PxV Porcentaje para elevar la potencia de 5 hm/, esto se usa en vacas, cabras y ovejas.

Método: 0.1 ml se inoculo en forma intradérmica, se aplica una a la derecha y otro a la izquierda (Tuberc - John).

Lectura: Desp/ de 72 horas, tumor duro más dolor - fiebre

más 3 ml (+)

menos de 3 ml (-)

## MEDIO DE CULTIVO PARA LEPTOSPIROSIS

### MEDIO KORTOFF + SUERO DE CONEJO

El medio se utiliza para aislamiento de Leptospira, además para realizar pasajes de Cepas de leptospira para su mantenimiento.

Cada lote del medio ha sido examinado con las 5 cepas de Leptospira; con resultados altamente satisfactorio.

#### METODO:

Hemocultivo: Por cada frasco de 10 ml. que contenga el medio de cultivo, se inocula 1 ml. de sangre problema, mezclar bien la muestra, y dejar entre 5 a 7 días, a una temperatura entre 30°C y 37°C (No pasarla 37°C), a los 7 días se retira con una jeringa esteril una gota del cultivo y se deposita sobre una lamina porta-objeto, se cubre con una laminilla, y se observa al microscopio con campo oscuro.

Si la gota sobre la lamina se presenta oscura por su concentración, para observar mejor se debe diluir con una solución salina 0,85 %.

El medio de cultivo se conserva a temperatura de refrigeración (2°C - 5°C.)

OBSERVACION DE TRICHOMONAS EN EL MICROSCOPIO

DIRECTO

- |                     |                            |
|---------------------|----------------------------|
| a. Bajo condensador | bajo x 10                  |
| Binocular x 10      | magnificación del objetivo |
|                     | alto x 40                  |

COLORACION DE GIEMSA

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| a - Frotis                                      | 1 gota de la suspensión del cultivo |
| b - Secado (con secador)                        | (aproximad 0.02 ml.)                |
| c - Fijar con alcohol etílico, de 3 a 5 minutos |                                     |
| d - Colorear con Giemsa durante 15 a 30 minutos |                                     |
| e - Lavar con agua de canilla y secar           |                                     |

SOLUCION BUFFER DE HADEN (usado para diluir el colorante de Giemsa)

FORMULA

K H <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> Anhidro	6.63 gr.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Anhidro	2.56 gr.

Lavar este buffer a la concentración x 10

El colorante de Giemsa a usar se prepara agregando 1 a 1.5 gota de colorante por 1 ml. de este diluyente buffer.

CULTIVO DE TRICHOMONAS

MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO SIN ANTIBIOTICO PARA SUBCULTIVOS:

Extracto de carne	10 gr.
Peptona	10 gr.
Dextrosa	10 gr.
Na Cl	3-5 gr.
Agua destilada / e.s.p.	1000 ml.
	ph 7.2 - 7.4
	+ Suero bovino 10%

MEDIO CON ANTIBIOTICO PARA CULTIVO PRIMARIO

Penicilina	500 - 1.000 U.I./ml.
Streptomocina	0.5 - 1 µg/ml
Extracto de carne	3 gr.
Peptona	10 gr.
Dextrosa	10 gr.
Na Cl	1 gr..
Agar	0.7 gr.
Agua destilada c.s.p.	1000 ml.
	ph 7.2 - 7.4
	Suero bovino 10 %

MEDIO USADO EN CASOS DE NO POSEER  
MEDIOS DE CULTIVOS COMERCIALES:

En lugar de Extracto de carne, es usado un caldo

Método de caldo

carne cortada

1.0 Kg. = 2.000 ml. de agua destilada

↓  
42° C durante una noche

↓  
Hervir por 2 hs.

↓  
Agregar agua destilada 500 ml. - 700 ml. A.D.

↓  
Filtrar (con papel de filtro)

↓  
primero con algodón

cambiar 2 veces

↓  
Seguiente

Filtrar con papel de filt  
cambiando 2 veces

↓  
Guardar

a - 20°C

## COLORACION DE GRAM Y PREPARACION DE OTROS COLORANTES

Método modificado de Hucker

1)	Solución A	Cristal violeta	0.3 gr.
		Alcohol 95 %	20 ml.
4)	Solución B	Oxalato de Amonio	0.8 gr.
		Agua destilada	80 ml.

En el momento de usar la solución A y B deben ser mezclados

- 1) El líquido de Hucker descrito, debe esparcirse sobre una lámina porta objeto durante 30 segundos a 1 min.
  - 2) Eliminar el líquido de Hucker y cubrir de nuevo con suficiente cantidad de lugar 1 min.
  - 3) Lavar con agua, secar con papel secante.
  - 4) Cubrir con saframina por 1 min.
- Lavar  
Secar  
Observar al microscopio

### \* PREPARACION DE COLORANTES - SOLUC. MADRE

- 1) 11 g. fucsina + alcohol (alcohol etílico) 100 ml.
- 2) Azul de Metileno 5 gr. + alcohol etílico 100 ml.
- 3) Violeta de Genciana 7 gr. + alcohol etílico 100 ml.
- 4) Safranina 2.5 gr. + alcohol etílico 100 ml.

### \* AZUL DE METILENO LOFFLER

Solución básica de Azul de Metileno	30 ml.
Solución de KOH al 0.01 %	100 ml.

### \* ZIEHL FUCSINA FENOLADA (Solución)

Solución de Fucsina básica	10 ml.
Solución Fenolada al 5 %	100 ml.

### \* VIOLETA DE GENCIANA FENOLADA (Solución)

Solución básica de Violeta de Genciana	10 ml.
Solución fenolada al 5 %	100 ml.

### \* SAFRANINA (solución)

Solución básica de safranina	1 gr.
Agua destilada	5 - 10 ml.

### \* LUGOL ( Solución)

Iodine	1 gr.
Iodine potásico	2 gr.
Agua destilada	300 ml.

Guardar un frascos color  
caramelo (marrón).

Primero se mezcla el iodine con el iodine potásico en un mortero con un foco de agua

SERVICIO NACIONAL DE SALUD ANIMAL

SENACSA

TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE AISLAMIENTO DE BRUCELA, Y FIJACION DE COMPLEMENTO

-- Medios de aislamiento, detección de Biocaracterística de brucela--

-- Modificación de la técnica de fijación de C', con relación al método de Calmers.

RECOPIACION: DR. SHIGEO NISHINO

PROYECTO DE MEJORAMIENTO DE LA REPRODUCCION ANIMAL

J. I. C. A. AÑO 1.986



PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO:

Ractivos:

Preparación de Veronal Buffer (VBD)

Solución Buffer Madre (cinco veces concentrado)

a) Combinar en el sgte. orden:

Na Cl.....83.00 gm.  
Na 5,5 diethyl barbiturate.....10.10 gm.  
Agua Destilada ..... ml.  
1 N hydrochloric acid                   43.58 ml.

Solución Madre conteniendo

1 molar Mg Cl<sub>2</sub> y 0.3 molar

Ca Cl<sub>2</sub> (20.3 gm. Mg Cl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O

y 4.4 gm Ca Cl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O en

100 ml de agua destilada

b) Mezclar.

c) Tomar el P H de la solución madre antes de refrigerarlo, preparando una dilución de 1:5 con agua destilada. El PH de la solución diluida debe ser de 7.3 a 7.4. Si el PH no está entre estos valores, se debe descartar y preparar una nueva solución madre.

2 - Preparación de solución de agua gelatinada

a) Agregar 1.0 gm. de gelatina a 100 ml. de agua destilada. Hervirlo para asegurar que la gelatina esta disuelta.

b) Completar a 800 ml. con agua destilada, a temperatura ambiente.

e) Enfriar en el refrigerador (esta solución no debe mantenerse más de 1 semana, para evitar contaminación.

3 - Preparación de VBD para uso diario (conteniendo 0,1 % de gelatina)

Agregar 4 volúmenes de agua gelatinada a 1 volumen de Buffer Madre. Guardar en el refrigerador.

El VBD no debe mantenerse por más de 24 horas.

4 - Preparación de suspensión de globo rojo al 2,8 %

a) Lavado de glob. rojos

1. Agregar 2 o 3 volúmenes de VBD frío a cada volumen de globo y centrifugar al 600 x g. por 5 .

2. Desechar el sobrenadante y los globulos blancos de la superficie, por succión, sin mover los eritrocitos.

3. Llenar el tubo nuevamente con VBD frío y mezclar suavemente los globulos. Centrifugar a 600 x g. por 5 minutos y repetir el proceso con un total de tres lavados Si el supernadante no es lo bastante claro, y sin color después del segundo lavado, indica que los glóbulos están muy Frágiles y no deben ser usados.

4. Resuspender los glóbulos una vez más en el tubo de centrifuga por 10 minutos al 600 x g.

5. Anotar el volumen de glóbulos rojo obtenido en el tubo de centrifuga y descartar el supernadante.

### Standardización de la suspensión de glóbulos rojo al 2,8 %:

Los glóbulos rojos se estandarizan por el método espectrofotométrico por el método de centrifugación siguiente:

- 1) Preparar el 2,8 % de la suspensión de glóbulos agregando 34,7 volúmenes de VBD a 1 volumen de glóbulos rojos de oveja. Agitarlo suavemente para asegurar la(suspensión)de losglóbulos.
- 2) Para chequear la densidad de la suspensión de glóbulo rojo al 2,8 % colocar 14 ml. en un tubo de centrífuga y centrifugarlo a 600 x g por 10 minutos. En 14 ml de una suspensión preparada apropiadamente debe producir 0.4 ml. de glóbulos rojos.
- 3) Cuando el volumen de glóbulos rojos está por debajo o encima de 0,4 ml., la suspensión debe ser ajustada. La cantidad de VBD que debe ser agregada o descartada de la suspensión está determinada por la sigte. fórmula:

$$\frac{\text{Valor de la lectura en el tubo de centrífuga}}{\text{Lectura correcta en el tubo de centrifugo}} \times \text{Volumen de la suspensión de células, es}$$
  
igual al volumen correcto de la suspensión.

- 4) Si la estandarización se realiza por medio de un espectro fotómetro, se procede de la sigte. manera:
  1. Preparar una suspensión de 3 % de rojos de oveja, lavados
  2. Preparar una solución acuosa bufferada (PH 7-3 a 7.4) disolviendo 5.10 gm. Na - 5,5 diethyl barbituate en 500 ml. de agua destilada. Agregar 17.29 ml. de 1/N HCl, y ajustar a 1 litro con agua destilada.  
Para usarlo, diluir a 1:5
  3. Lisar 1.0 ml. de la suspensión con 14.0 ml. de buffer .
  4. Colocar esta solución de hemoglobina en una cubeta v leer la densidad optica, contra un apropiado blanco.El 2.8 % de suspensión es calculado por:

D.O del 3 % de glóbulos

D.O. deseada

Debe tenerse en cuenta que la D.O. de la oxihemoglobina varía según el instrumento que se emplea. Cada laboratorio deberá determinar experimentalmente la D.O. para su propio instrumento.

#### Preparación de colores standard de Hemoglobina:

Para la lectura de las titulaciones de hemolisina, complemento y antígeno, se usan nueve colores patrones.

Estos patrones se preparan combinando cantidades proporcionales de solución de hemoglobina y suspensión de glóbulos rojos al 0,28 %.

como sigue:

PREPARACION DE COLORES PATRONES

Reactivos, ml.	Porcentaje de Hemólisis											
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Solución de Hemo- globina -----	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	
0.28 % de glóbu- los rojos -----	1.0	.9	.8	.7	.6	.5	.4	.3	.2	.1	0	

Mezclar las diversas cantidades de solución de hemoglobina y la suspensión de hemoglobina y la suspensión de glóbulos al 0,28, como muestra en la tabla.

b) Agitar los tubos y centrifugar a 600 x gr. por 5 minutos. Sacar de la centrifuga evitando mover. Cuando no se usa, mantenerlo en el refrigerador.

MEDIOS SECTIVOS

SUERO - DEXTROSA - AGAR - MEDIO MODIFICADO DE FARRELLS

Antibiotico	Concentracion Final aproximada	Solucion	1 litro de solucion base-Volumen de Stock	Preparacion de la solucion	Conservacion
Bacitracina	25 U./ml.	100.000U/ml	12.5 ml.	65.000 u/gr. 65.000 = 1:X X = 1.538 8l/50 ml. D.U.	4 <sup>o</sup> C
Polimixina B	5 U./ml.	80.000 U/ml.	1.0 ml.	80.000 U/10 mgr. + 16 ml. D.U. (2 ml x 8 tubos)	- 20 <sup>o</sup> C
Cicloheximi de	100 ug/ml	800.000ug/ml	10.0 ml.	1) 800 mg/4ml de acetona 2) + 76 ml de D.U.	
Vancomicina	20 4 g/ml	50 mg/ml	0.4 ml.	50 mg/1.0 ml D.U.	
Acido Nalidixico	54 g/ml	5 mg/ml	10 ml	105 mg/2ml 0.5 M.NaOH (conservado 94 <sup>o</sup> C) Antes de usar, 0,2 ml de esta solucion se agrega a 1.8 en D. U.	Antes de usar
Nistatin	100 u./ml	50.000 <sup>U</sup> /ml 25 mg/3ml	2.0ml	25 mg/3ml D.U.	Antes de usar

## MEDIOS DE CULTIVO PARA BRUCELA

### 1.- GENERAL

- a. Suero - dextrosa agar (SDA) : aislamiento primario, subcultivo de Brucela
  - b. Suero - triptosa Agar(Difco)
  - c. Suero - tripticasa - Soya - Agar (BBL)
  - d. Dextrosa glicerinada (2:1) Agar (GDA) para control de disociación de cultivos
- 2.- Caldo Allimi para propagación de Brucela - Cultivo general de las Cepas de Fago

### MEDIOS PARA TEST DE SENSIBILIDAD CON COLORANTES

S D A es recomendado para este propósito  
concentración usada en los medios para test de sensibilidad

Inhibidor	Solución stock	Volumen a agregar a 1 litro	Concentración Final
Fucsina basica	0.2 % u/v	10 ml.	1/50.000
Tionina	0.2 % u/v	10 ml.	1/50.000

## MEDIOS DE CULTIVOS:

### 1. GENERAL

#### SUERO DEXTROSA AGAR (SDA)

Este medio es recomendado para mantenimiento y aislamiento primario de Brucelas de muestras no contaminadas tales como lo obtenidos de autopsias de cobayos, bazo, no es recomendable para aislamiento primario de materiales muy contaminados como: leche, placenta, semen.

#### FORMULA:

Triptosa - Soy - Agar - BBL .....40 gr.  
Agua destilada .....1.000 ml.  
Suero equino inactivado ..... 50 ml. (56°C x 30 min)  
(filtrado con membrana de 0.45 µm)  
25 % Dextrosa 110°C 10 min. Autoclave 40 ml.

Después de autoclavar el medio; se mantiene a una temperatura de 56°C y se le agrega el suero equino y la dextrosa.

### 2. SELECTIVO:

SDA puede ser preparado como medio selectivo para Brucelas por la adición de antibióticos y agentes microbionos. La formula desarrollada por Farrell es recomendada para aislamiento de Brucelas de materiales probablemente contaminados: leche, placenta, semen y flujos vaginales.

En la preparación se usa como medio base SDA; y se agrega Bacitracina, Cicloheximide, Acido Nalidixico, Nistatin y Polimixina B.

La solución stock de este preparado es como sigue.

#### a - Bacitracina:

El polvo esteril se disuelve en agua destilada esteril en una concentración de 2.000 U/ml. y se guarda a 4°C.

#### b - Cicloheximide (Actidione)

La solución stok contiene 10.000 mg/ml se prepara disolviendo 1 gr. de Actidione en 5 ml de acetona y se lleva a la dilución 1:20 con agua destilada. Se guarda a 4°C.

#### c - Acido Nalidixico

5 % peso/volumen la solución stock es preparada en 0.5 ml/l.

Na OH, se guarda a 4°C inmediatamente antes del uso se lleva a la dilución 1:20 con agua destilada.

d - Nistatin: inmediatamente antes de usar el polvo esteril se suspende en agua destilada esteril hasta llevar a una concentración de 50.000 U/ml.

#### e - Polimixina B

El polvo esteril se disuelve en agua destilada esteril, a una concentración de 5.000 u/ml, se guarda a una temperatura de 20°C. El resto de solución no usada se debe descartar y no volver a congelar.

f - Vancomicina

Se prepara la solución stock con una concentración de 50 mg/ml disolviendo el polvo en agua destilada estéril inmediatamente antes de usar.

El volumen de cada solución stock del antibiotico a ser agregado a cada 1 litro del medio SDA, se indica en la siguiente tabla.

Composición de Antibioticos para medio de Farrelis		
Antibiotico	Volumen de la solución stock por 1 litro del medio base	Concentración final aproximada
Bacitracina	12,5 ml	25 U/ml.
Polimixina B	1 ml	5 U./ml.
Cicloheximide	10 ml	100 mg/ml.
Vancomicina	0.4 ml	25 mg/ml
Acido Nalidixico	1 ml	5 mg/ml
Nistatin	2 ml	100 U./ml.

Test de producción de Sulfhidrico

Tiras de papel de filtro (cortados en pequeñas laminas) son humedecidos en una solución de Acetato de plomo al 10%, luego se secan a 37°C en un ambiente libre de H<sub>2</sub>S. Una vez seco.

El papel, son cortado en tiras 8x07 cm; y envueltos en papel impermeable se guardan en recipientes de 50 cm; con vacio.

Requerimientos de CO<sub>2</sub> al 10 %

Sensibilidad a colorantes

Tiras de papel de filtro son humedecidos en una solución de Tionina 1:600; solución de Fucsina basica 1:200 y puestos a secar a 37°C; luego del secado las tiras de papel se cortan de 8 x 0.7 cm.

Producción de Ureasa

	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	4.8 gr.
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8 gr.
Solución A	Extracto de Levaduras	2 ml.
100 ml	Agua destilada	98 ml.
	Rojo Fenol al 0.2%	1 ml.

Solución B	Urea al 20%	20 ml
	(filtrado con membrana de 0.45 um.)	

Se mezclan las soluciones A y B en un tubo en un volumen de 0.5 ml, y en el se inocula las colonias.

Cambio a color rojo dentro de 20 min.	Positivo
Sin cambio de color después de 24 hs.	Negativo

### Antisuero

Antisueros de cepas lisas y rugosas de Brucelas se preparan usando conejos hembras de 6 meses de edad, sanas y grandes. Antes de usar el animal, se somete una prueba de sero - aglutinación, y debe estar libre de aglutininas no específicas y de anticuerpos antibrucelas.

### Antisuero de Cepa lisa de Brucela

a. Preparar una suspensión de Bs Abortus, Cepa 544 (Lisa) o Br Melitensis Cepa 16 M conteniendo aproximadamente  $5 \times 10^9$  células / ml; en un volumen de 0.15 ml/litro de NaCl.

b. Inyectar 1 ml. de esta suspensión via intravenosa en conejos.

c. Sangrar el conejo después de 12 - 14 días y realizar test de seroaglutinación para Brucelas. Después de este tiempo la mayoría de los animales tendrán un título al menos de 1/640 en la seroaglutinación standard. Estos animales luego son sangrados y sus suero se mezclan.

d. El suero mezclado es diluido 1:10 en una solución fenolada al 0.5 % (peso/volumen) en 0.5 ml/litro de NaCl y se prueba su habilidad de aglutinar cepas de Brucela sobre laminas haciendo test de aglutinación.



- 4) El suero diluido debe aglutinar con suspensión de cepas lisas de Br. Suis, Br. Abortus y Br. Melitensis, casi inmediatamente. El suero fenolado debe ser fuardado a 4° C, hasta su uso, pero no se debe volver a congelar después de su uso.

ANTISUERO MONOESFERICO A y M

- a. Se prepara suspensiones de cepas lisas de Br. Abortus biotipo 1, Cepa 544 y Br. Melitensis biotipo 1, Cepa 16 M, conteniendo aproximadamente  $10^9$  microorganismos viables por ml en PBS.
- b. Inyectar una sola dosis de 0.5 ml via endovenosa en conejas.
- c. Sangrar el animal diariamente, desde el 5º día en adelante y se titula el suero determinando las aglutininas brucelicas. Al 9º o 10º día los animales tendrán títulos de seroaglutinación al menos 1: 1280
- d. Sangrar aquellos animales con alto título de aglutinación y preparar mezcla de antisueros contra Br. Abortus y Br. Melitensis.
- e. Titular cada mezcla de suero en la prueba de seroaglutinación contra suspensiones standard de Br. Abortus y Br. Melitensis. Un título de al menos 1: 1280 contra el antígeno homologo es satisfactorio.
- f. Determinar la cantidad de conglomerado celular de Brucelas de especies heterologous requeridos, para eliminar aglutininas que produscan reacción cruzada de cada serie de sueros. Esto debería ser hecho a través de pruebas continuas de 5 ml de volúmenes, casualmente cerca de 1 ml conglomerado titular se necesita por cada 10 ml de antisuero.
- g. Absorber cada serie mezclando con el apropiado volúmen del conglomerado celular, ponerlo a 37° C durante 2 horas. Recuperar el antisuero por centrifugación y titularlo de nuevo contra el antígeno homologo y heterologo de Brucela. Después de una absorción satisfactoria, aglutina el antígeno homologo en una dilución de al menos 1: 160 pero no aglutina el antígeno heterologo en la dilución 1: 10. Si es necesario el proceso de absorción debe ser repetido hasta que se reúnan esas condiciones.
- h. Diluir el suero absorbido 1:5 en salina fenolada (0,5% fenol en 0.15 mol litro NaCl) y probar su reacción de aglutinación con Br. Abortus y Br. Melitensis sobre lámina portaobjeto. Los sueros monoespedíficos satisfactorios rápidamente aglutina con microorganismos homólogos, pero tienen visible efecto sobre especies heterologos.
- i. El suero diluido se guarda a 4° C, hasta su uso; pero se debe calentarlo a temperatura ambiente antes de usarlo. No debe ser vuelto a calentar después de usarlo.

## FAGOS

La Brucela Fago, es usado corrientemente como de rutina en la identificación de Brucelas. Los Fagos Tb, Wb, F<sub>2</sub>, Bk y cepa R son clasificados en la sección del género Brucela.

Stock de semillas de estos fagos son mantenidos en este laboratorio.

## PROPAGACION

La cepa huésped recomendada para la propagación de Fagos Tb y F<sub>2</sub> es la cepa lisa de Br. Abortus 19. Para el Fago Wb, cepa lisa de Br. Suis 1.330 y para el Fago Bk, cepa lisa de Br. Melitis.

Para la propagación del Fago R, se recomienda la cepa rugosa de Br. Abortus 45/20 o B 111 a R.

- a. Las cepas crecen muy bien en tubos inclinados de SDA (pico de flauta) se incuban a 17° C durante 24 - 36 horas. Luego las colonias se suspenden en caldo Albini de Brucela en una concentración aproximada de  $10^{10}$  células / ml. El stock de Fago para completa definición debe ser entre  $10^4$  y  $10^5$  unidades de placas lisadas / ml (p.f.u).
- b. A 0.1 ml de la suspensión de la cepa propagada y un igual volumen del stock del Fago se colocan en el centro de una placa de SDA. El líquido es esparcido uniformemente sobre la superficie del agar usando una varilla de vidrio o de acero inoxidable en forma de L.
- c. Las placas que muestren confluencia o casi confluencia de lisis de la cepa huésped; que no tenga contaminación bacteriana son seleccionados. Cada placa es luego imendada con 3 ml del caldo Albini de Brucela estéril y se deja clarear en posición horizontal por 10 min a temperatura ambiente.
- e. El líquido de cada plato es vertido en un frasco estéril para formar la solución bruta del Fago.
- f. La solución bruta del fago es clasificada por centrifugación a 500 g durante 10 - 15 min y filtrado a través de membrana de 0.45  $\mu$ m. El filtrado luego se satura con tolueno y se guarda a 4° C.
- g. Antes del uso el título de la solución stock del Fago y el promedio del patrón deben de ser determinados.

## TITULACION DEL STOCK DE FAGO

Con el propósito de cultivos de tipificación, el fago de brucelas son normalmente usados en la dilución del test de rutina (RTD).

Esto se define como la más baja concentración de fago que produzca lisis confluyente en el contorno de la cepa de propagación.

Para determinar esto:

- a. Preparar diluciones en serie del fago en la escala de  $10^{-1}$  y  $10^{-9}$  en caldo Albimi de Brucela, estéril, usando una pipeta separada por cada etapa.
- b. Colocar 0.1 ml de suspensión stock de la cepa propagada sobre placas de SDA, extenderlo sobre la superficie usando vidrio o acero inoxidable en L. Secar la placa a temperatura ambiente por 1 hora.
- c. Se dejan gotear con pipetas standard las diluciones del fago, desde 50 gotas de pipeta, sobre la superficie del agar. Las gotas deben ser uniformes y bien separadas, por tanto, no deberían ser colocadas en exceso en una sola placa. La posición y dilución de cada gota deben ser conocidas.
- d. Dejar la placa en reposo a temperatura ambiente por 1 hora luego invertirlo e incubar a  $37^{\circ}$  C por 48 a 72 horas para Fagos Bk y R.
- e. Examinar las placas y determinar la mas alta dilución en donde se produce la lisis confluyente. Esta es la RTD. El título de fago en P.F.U./ml puede ser determinado contando el N° de placas producidas por una unidad volumen de la dilución límite. El conteo se debe limitar a las diluciones que produzcan buena y bien separadas placas.

SERVICIO NACIONAL DE SALUD ANIMAL

SENACSA

Investigaciones

Realizadas en la División de Brucelosis de Noviembre de 1985 a Noviembre de 1986.

CONTRAPARTES

Dr. Julio Ruben Brambilla  
Dra. Angela F. de Dalles  
Dra. Nelly Ortíz Rodriguez  
Dr. Hugo Loup Reyes  
Dra. Graciela de Insfran  
Dr. Carlos Sosa Otto  
Dra. Maria Stela Fiore Canota

EXPERTO

Dr. Shigeo Nishino

PROYECTO DE MEJORAMIENTO DE LA REPRODUCCION ANIMAL

J.I.C.A.      AÑO 1.986

## CONTENIDO

1. Aplicación de la técnica de Rosa de Bengala para determinar niveles de anticuerpos en U.I.
2. Estudio de Producción de Hemolisina
3. Estudio de Incidencia de Brucelosis en Cabra.
4. Aislamiento y tipificación de *Brucella melitensis*.



# SERVICIO NACIONAL DE SALUD ANIMAL SENACSA

DIRECCION: Km. 10 1/2 RUTA MCAL. ESTIGARRIBIA - SAN LORENZO  
CASILLA DE CORREO No. 1110 - ASUNCION, PARAGUAY

## APLICACION DE LA TECNICA DE ROSA DE BENGALA PARA DETERMINAR NIVELES DE ANTICUERPOS EN U.I.

### 1.- OBJETO:

La prueba de Rosa de Bengala es utilizada para detectar anticuerpos de la clase IgG; de ahí su utilidad en la detección de anticuerpos de origen brucélico.

Ahora, para obtener título final de anticuerpos IgG, se realiza la prueba del 2-ME; y el resultado se obtiene recién a los 48 hs. Por tanto, la prueba de Rosa de Bengala sería muy útil realizarlo de rutina para determinar el título de anticuerpos IgG; además de la prueba del 2-ME.

De ahí que todos los sueros reaccionantes, deberían ser diluidos y sometidos a la prueba de Rosa de Bengala, estas pruebas tendrían resultados coincidentes con la prueba del 2-ME en la titulación final del suero; pudiendo detectar de esta forma los niveles de IgG en solo 4 minutos; y puede ser usado como prueba de rutina.

### 2.- METODO:      TITULACION DEL SUERO

S.S.F.	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
SUERO	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
DILUCION	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
SUERO DILUIDO	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
AG. R. DE B.	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03

TITULO FINAL	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	60 U.I.	120 U.I.	240 U.I.	480 U.I.	960 U.I.



# SERVICIO NACIONAL DE SALUD ANIMAL SENACSA

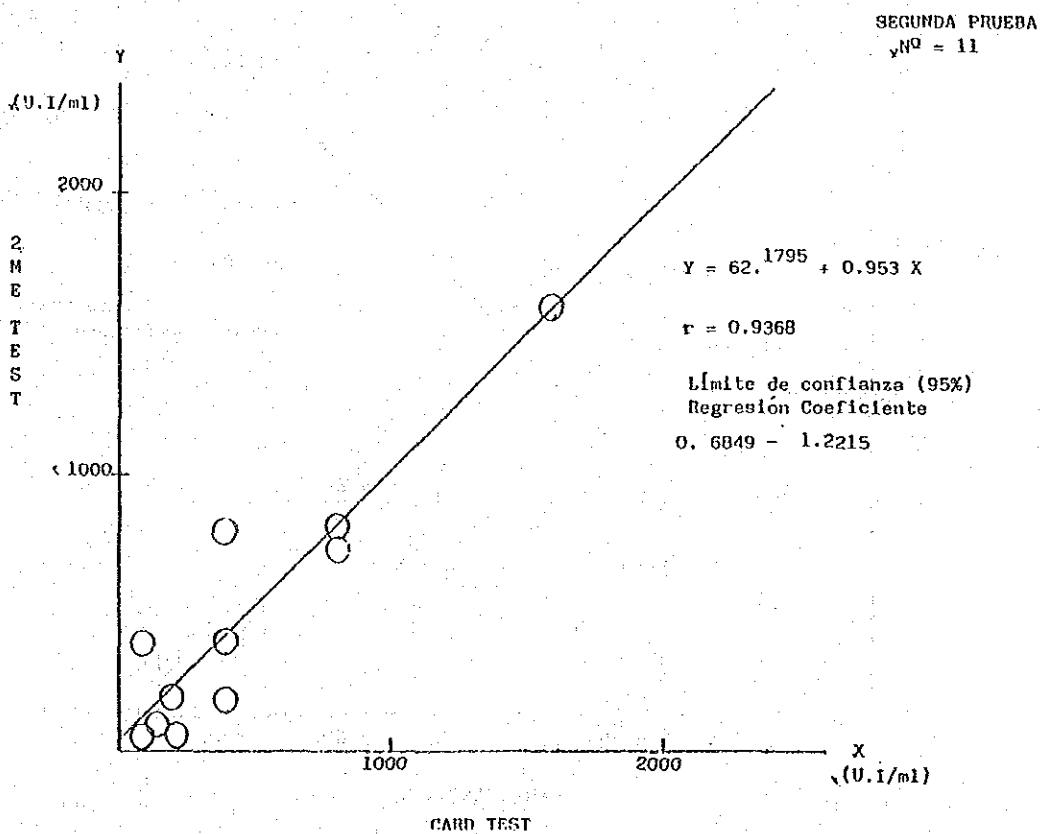
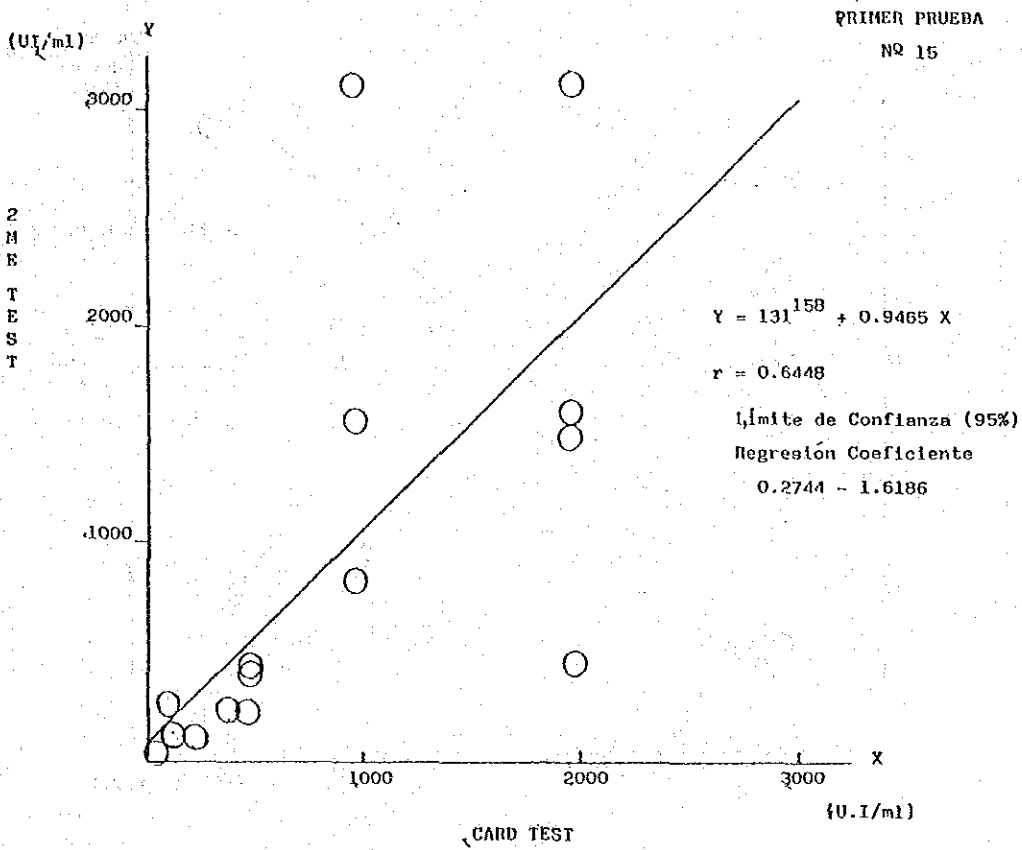
DIRECCION: Km. 10 1/2 RUTA MCAL. ESTIGARRIBIA - SAN LORENZO  
CASILLA DE CORREO No. 1110 - ASUNCION, PARAGUAY

## CUADRO DE INTERPRETACION DE RESULTADOS, COMPARANDO CARD TEST Y 2 - ME

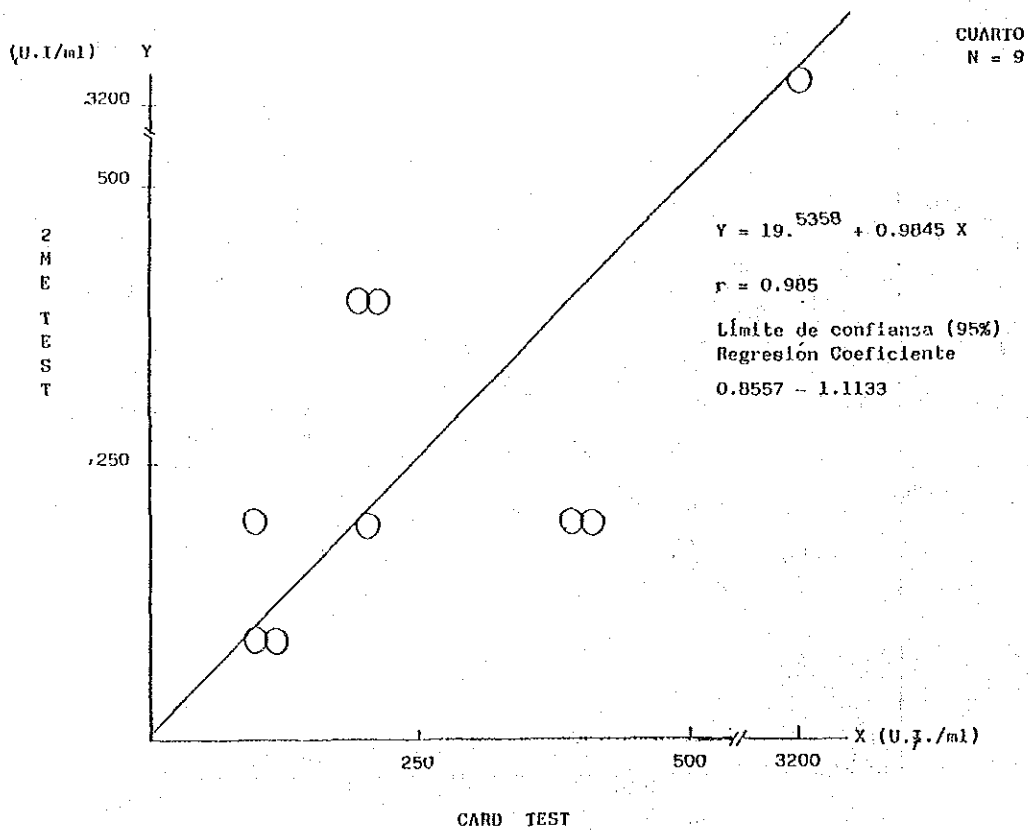
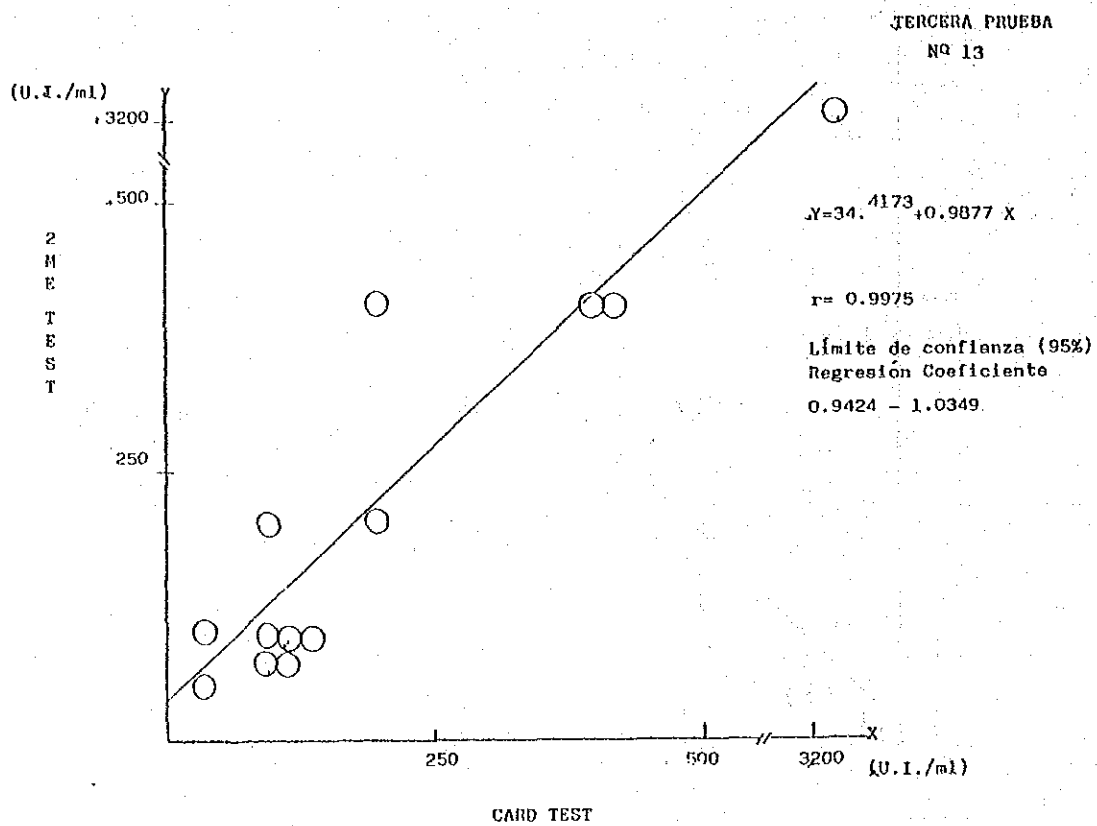
<u>CARD TEST</u>		<u>2. MERCAPTO-ETANOL</u>	
<u>DILUCION</u>	<u>U.I.</u>	<u>DILUCION</u>	<u>U.I.</u>
1:2	30	1:25	25
1:4	60	1:50	50
1:8	120	1:100	100
1:16	240	1:200	200
1:32	480	1:400	400
1:64	960	1:800	800
1:128	1.920	1:1.600	1.600
1:128	1.920	1:3.200	3.200
1:256	3.840		

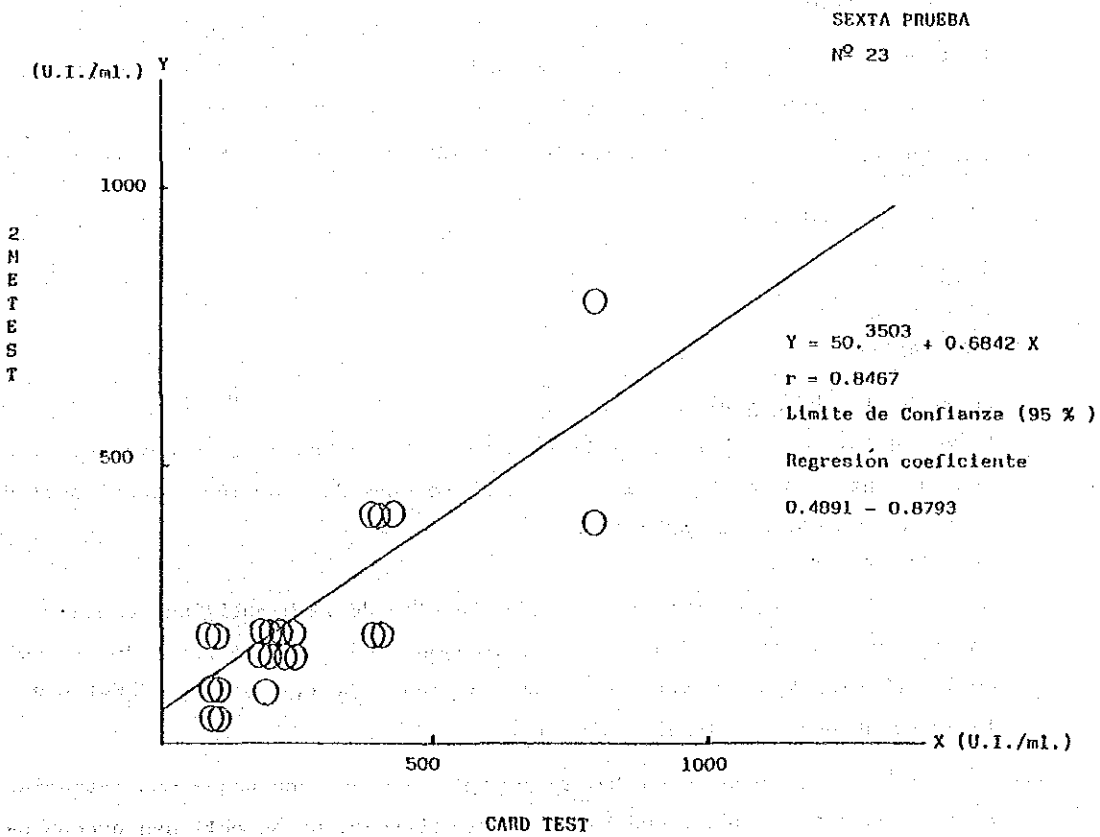
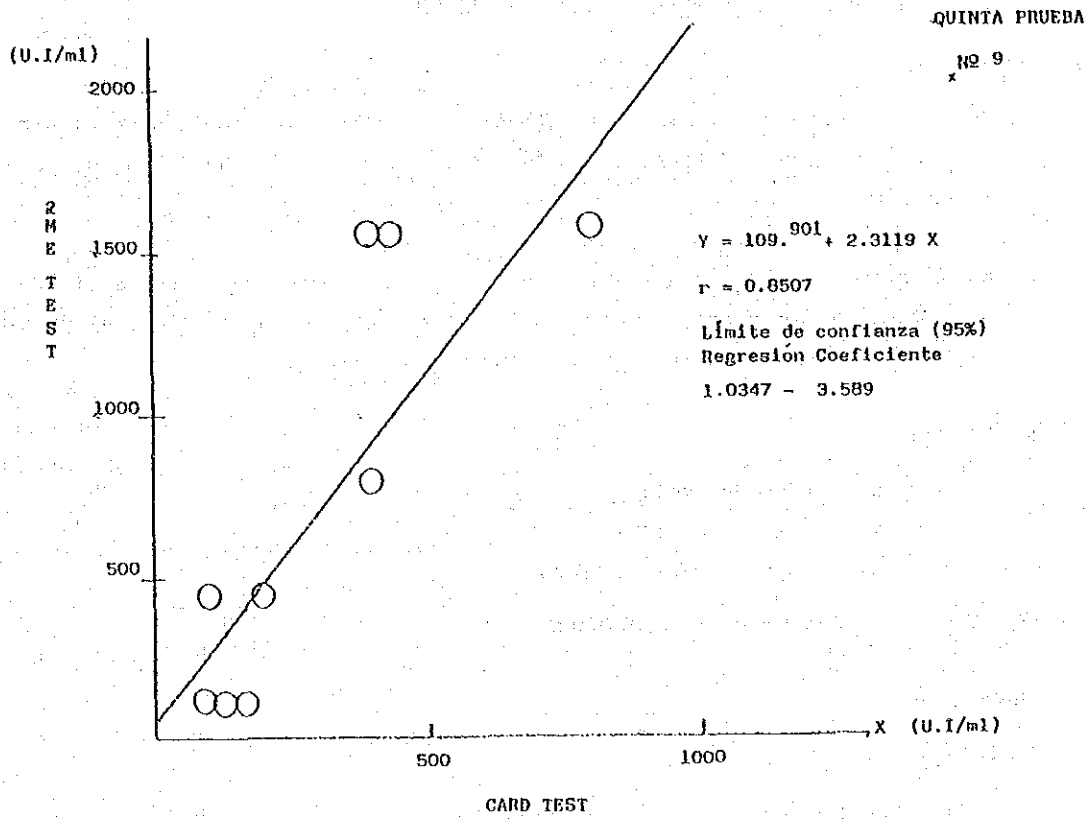
### 2° METODO MODIFICADO

S.S.F.	0,67	0,5	0,5	0,5	0,5
SUERO	0,33	0,5	0,5	0,5	0,5
	↓	↓	↓	↓	↓
SUERO DILUIDO	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
AG. R. DEB.	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
TITULO FINAL	100 U.I.	200 U.I.	400 U.I.	800 U.I.	1600 U.I.









## ESTUDIO DE PRODUCCION DE HEMOLISINA

### I OBJETIVO:

(Division de Brucelosis)

- 1) Como en el Paraguay, en especial SENACSA, no se ha producido aun hemolisina, para la prueba de Fijación de complemento, entonces hemos hecho un ensayo de producción.
- 2) La producción se ha hecho también en diferentes condiciones para realizar un estudio de los resultados obtenidos teniendo en cuenta el clima, el porcentaje de Gl. rojos inoculados y volúmenes del mismo.

### II MATERIALES:

- 1 - Glóbulos rojos de oveja
- 2 - Anticoagulante : ALSEVER
- 3 - Solución salina Normal (0.85 %)

### III CONDICIONES O METODOS DE : PRODUCCION ( ver hoja anexa)

### IV RESULTADOS:

Lote N<sup>o</sup> 1:

Título: 1:1.500 U.

Lote N<sup>o</sup> 2:

Título: 1:750 U.

Lote N<sup>o</sup> 3:

Título: 1:500 U.

Lote N<sup>o</sup> 4:

Título: 1: 2.000 U.

Título N<sup>o</sup> 5

Título: 1:2000 U.

### V CONCLUSION:

Lotes N<sup>o</sup> 1 , N<sup>o</sup> 2 y N<sup>o</sup> 3

- 1) En estos 3 lotes se han obtenido títulos bastante bajos de la hemolisina, posiblemente debidos a las bajas concentraciones de globulos rojos inoculados y durante un clima muy caluroso.

Lotes N<sup>o</sup> 4 y N<sup>o</sup> 5

- 2) En ambos lotes se han obtenido títulos iguales de la hemolisina, a pesar de la diferente concentración de glóbulos rojos usados e intervalos de tiempo de inoculación también diferentes usados para cada uno de ellos. Estos 2 lotes se produjeron durante clima frío.
- 3) Según los resultados obtenidos se pueden decir que con bajas concentraciones de gl. rojos inoculados durante un clima caluroso, no se obtienen buenos resultados. Sin embargo, con inoculaciones de globulos rojos más concentrados (5 % a 10 %) y durante en clima frío se obtienen títulos optimos.

III      CONDICIONES DE PRODUCCION : Lotes 1 - 2 y 3

Se produjeron 3 lotes de Hemosilina realizado en ellos seis inoculaciones de glóbulos rojos a conejos: Se inocularon 1 ml. de gl. rojo al 0,5 % en el 1<sup>er</sup> día, luego, en la 2<sup>da</sup>. y 3<sup>era</sup>. inoculación se usaron globulos rojos al 1%.

En la 2<sup>a</sup>. inoculación 1 ml. y en la 3<sup>a</sup>. inoculación 2 ml..

En la 4<sup>ta</sup>. inoculación se usó 3 ml. gl. rojo al 2 %; en la 5<sup>ta</sup>. inoculación 3 ml. de gl. rojo al 5 % y en la 6<sup>ta</sup>. inoculación 7 ml. de gl. rojo al 5 %. Es decir, en cada inoculación se ha aumentado en pequeñas proporciones el % de glóbulos rojos y el volumen inoculado todas las inoculaciones se han realizado cada 5 días, es decir, hubo un período de descanso entre una inoculación y otra.

Lotes 4 y 5

Estos dos lotes se han producido en la misma fecha, es decir, en iguales condiciones de clima.

Para la producción del lote 4 , se han usado glóbulos rojos al 5% para todas las inoculaciones, pero aumentando el volumen del mismo para cada inoculación.

Así, el 1<sup>er</sup>. día se inculó 0,5 ml., el 2<sup>da</sup>. día 1 ml. y luego , para las sgtes se aumentaron 1 ml. para cada inoculación.

En este caso, se hicieron las inoculaciones cada 2 días.

Para el lote 5 se usaron glóbulos rojos al 10 % ; en inoculaciones diarias de 5 ml. de gl. rojos, durante 6 días consecutivos y luego 3 inoculaciones de 10 ml. de gl. rojos cada 2 días.

PRODUCCIÓN DE HEMOLISINA

<u>LOTE Nº</u>	<u>FECHA</u>	<u>CANTIDAD DE CONEJOS</u>	<u>RESULTADO/U.I.</u>
1	15-I-a127-II-86	1	1/1.500 U.I.
2	5-IIIa1-15-IV-86	1	1/750 U.I.
3	2-V-a1-16-VI-86	1	1/500 U.I.
4	22-VIIa1VIII-86	1	1/2.000 U.I.
5	22-VIIa1 13-VIII-86	1	1/2.000 U.I.

METODO DE HACER HEMOLISINA

(LOTE N<sup>o</sup> 1)

<u>TIEMPO</u>	<u>FECHA INOCULACION</u>	<u>METODO INOCULACION</u>
1	15 - I - 86	INTRAVENOSO; GL. ROJO - OVEJA 0.5 % 1 ml.
2	20 - I - 86	1.0 % 1 ml.
3	24 - I - 86	1.0 % 2 ml.
4	29 - I - 86	2.0 % 3 ml.
5	4 - II - 86	5.0 % 3 ml. EXTRAER SANGRE 10 ml.
6	10 - II - 86	5.0 % 7 ml. SACRIFICAR EL CONEJO
7	27 - II - 86	EXTRACCION DE SANGRE CENTRIFUGE.

OBS: TITULACION DE HEMOLISINA 1 : 1.500 U.I./ml.

ELABORACION DE HEMOLISINA EN CONEJO

(LOTE N<sup>o</sup> 2)

	<u>FECHA DE INOCULACION</u>	<u>GL. ROJO DE OVEJA</u>	
1)	5 - III	0.5 %	1 ml.
2)	10 - III	1.0 %	1 ml.
3)	14 - III	1.0 %	2 ml.
4)	19 - III	2.0 %	3 ml.
5)	25 - III	5.0 %	3 ml.
6)	31 - III	5.0 %	7 ml.
7)	15 - IV	EXTRACCION DE SANGRE	

OBS: EL GL. ROJO OVEJA DILUIR EN SOLUCION SALINA ESTERILIZADA.

ELABORACION DE HEMOLISINA EN CONEJO

(LOTE Nº 3)

<u>FECHA DE INOCULACION</u>	<u>CANTIDAD EN ML.</u>	<u>PORCENTAJE DE GLOBULO DE OVEJA</u>
) 2 - V - 86	1 ML.	0.5 %
!) 7 - V - 86	1 ML.	100 %
) 12 - V - 86	2 ML.	100 %
) 16 - V - 86	3 ML.	200 %
) 21 - V - 86	3 ML.	500 %
) 26 - V - 86	5 ML.	500 %
30 - V - 86	7 ML.	500 %

16 - VI - 86

EXTRACCIÓN DE SANGRE - CENTRIFUGA



PRODUCCION DE HEMOLISINA (LOTE N° 4)

1. DIA 22 - VII 1) 0.5 ml. I.V. 5 ml. - GLOBULO ROJO 5 %  
95 ml. - SOLUCION SALINA
2. "
3. " 24 - VII 2) 1 ml. I.V.
4. "
5. " 26 - VII 3) 2 ml. I.V.
6. "
7. " 28 - VII 4) 3 ml. I.V.
8. "
9. " 30 - VII 5) 4 ml. I.V.
10. "
- 11 " 1 - VII 6) 5 ml. I.V.
- 12 "
13. " 3 - VII 7) 6 ml. I.V.
14. "
- 15 "
16. "
17. "
18. " SACAR SANGRE

PRODUCCION HEMOLISINA

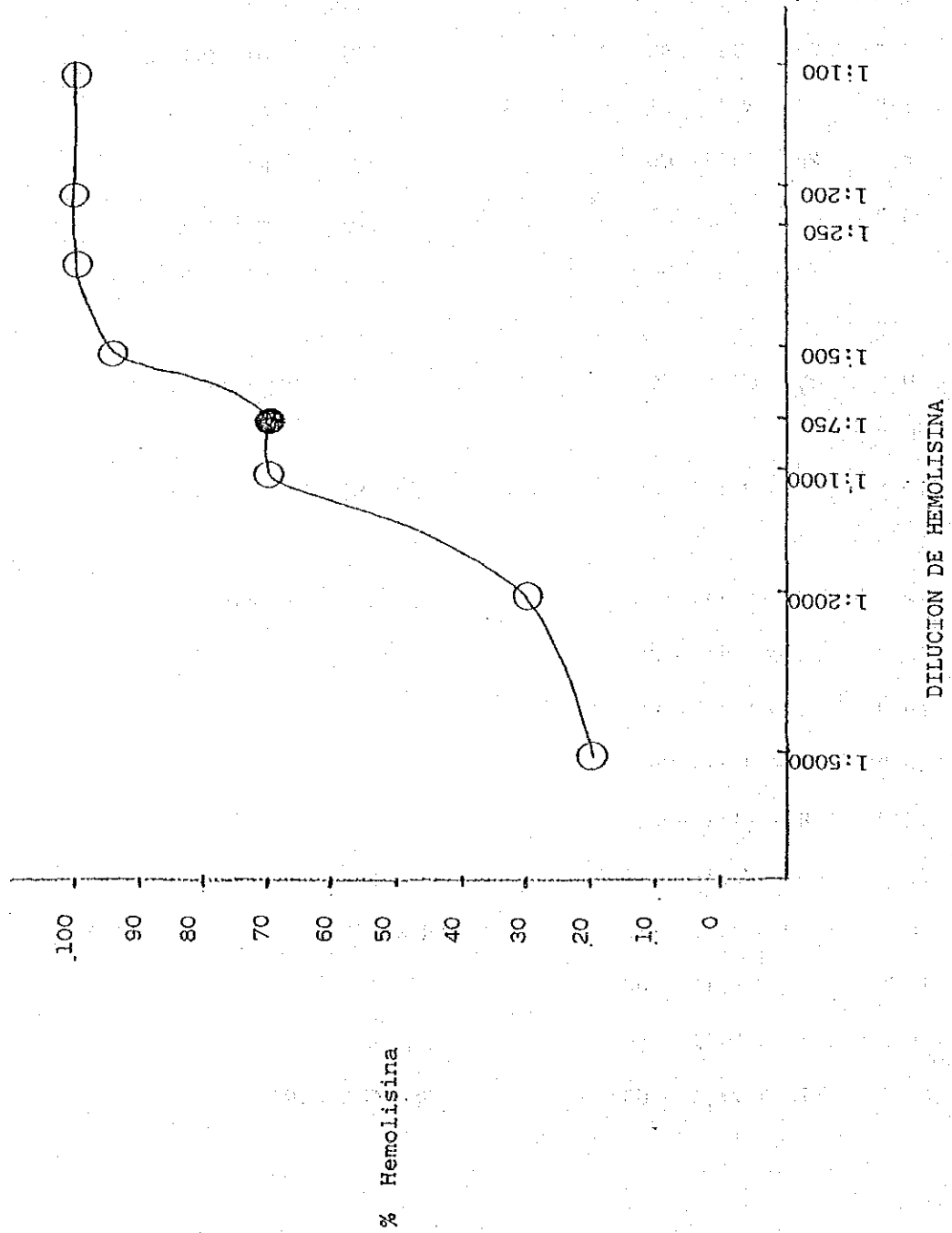
(LOTE Nº 5) :

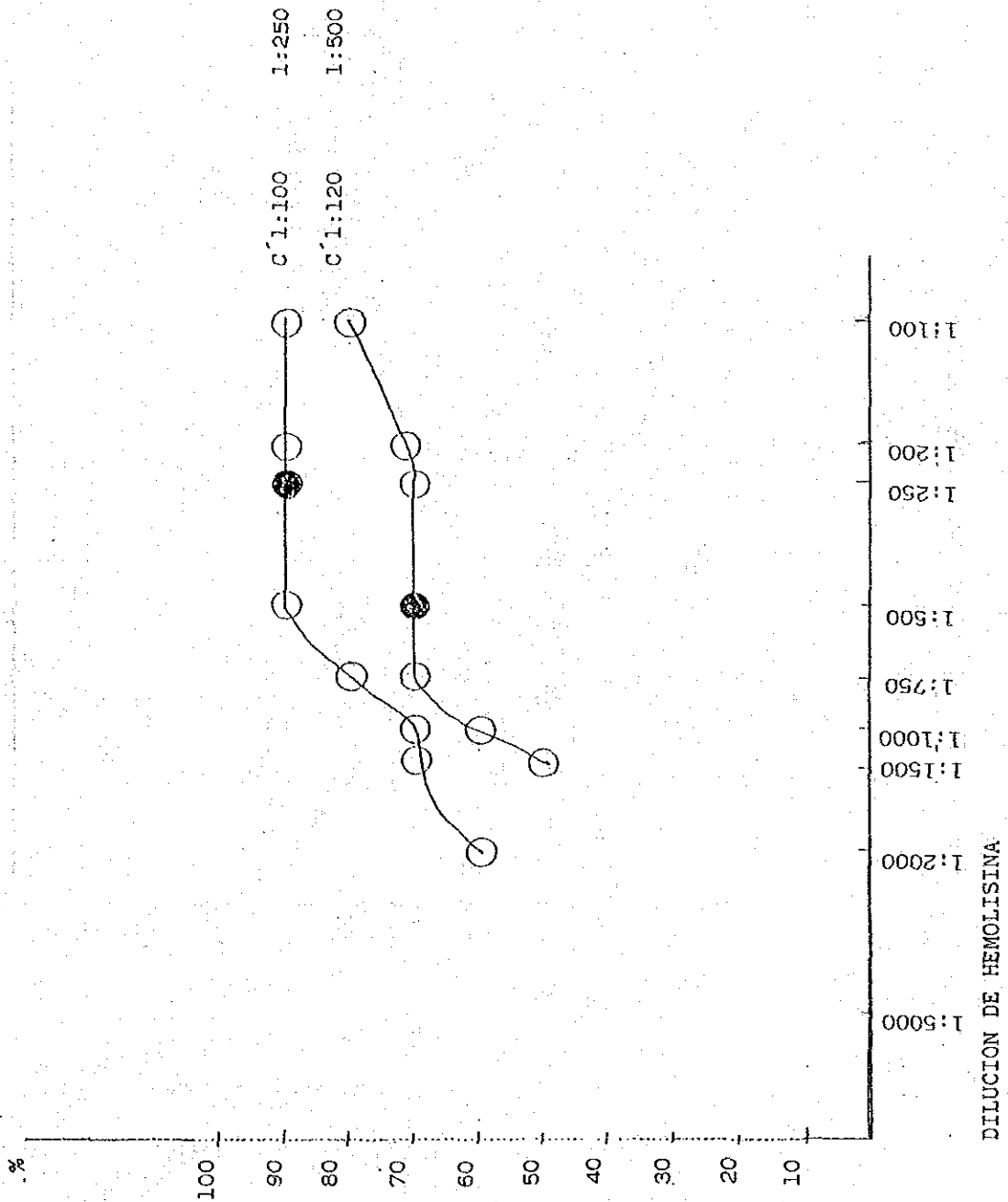
GLOBULO ROJO DE OVEJA	10 %	10 ml. GLOBULO ROJO 90 ml. P.B.S.
1 DIA 22 - VII - 86	1)	5 ml. I.V.
2 " 23 - VII - 86	2)	5 ml. I.V.
3 " 24 - VII - 86	3)	5 ml. I.V.
4 " 25 - VII - 86	4)	5 ml. I.V.
5 " 26 - VII - 86	5)	5 ml. I.V.
6 " 27 - VII - 86	6)	5 ml. I.V.
7 "		
8 " 30 - VII - 86	7)	10 ml. I.V.
9 "		
10 " 1 - VIII - 86	8)	10 ml. I.V.
11 "		
12 " 4 - VIII - 86	9)	10 ml. I.V.
13 " 5 - VIII - 86		
14 " 6 - VIII - 86		
15 " 7 - VIII - 86		
16 " 8 - VIII - 86		
17 " 9 - VIII - 86		
18 " 10 - VIII - 86	SACAR SANGRE	(SE SANGRO EL 14 - VIII - 86
19 " 11 - VIII - 86		
20 " 12 - VIII - 86		
21 " 13 - VIII - 86	SACAR SANGRE	

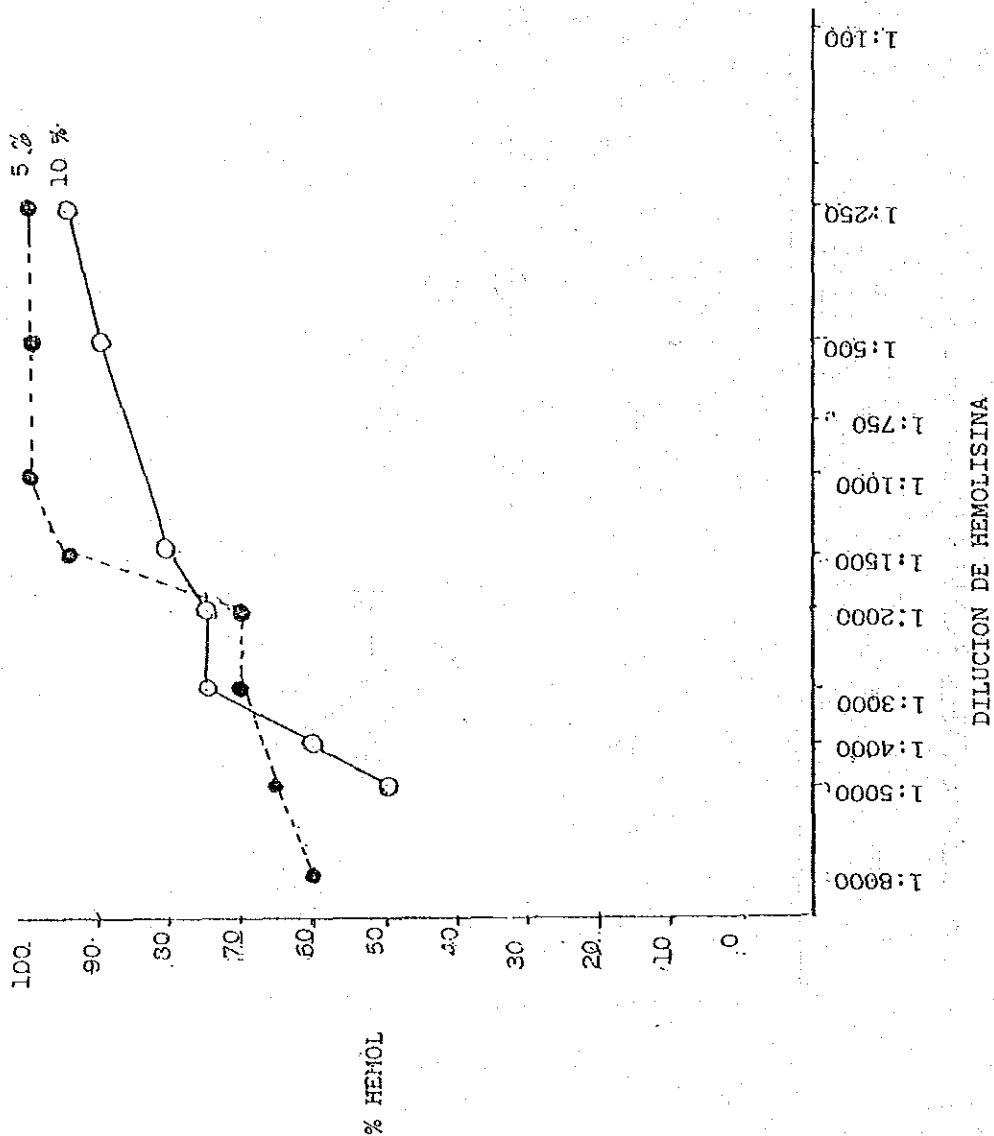
OBS: Titulación de Hemolisina 1:2000 u.

TITULACION DE HEMOLISINA

7 - VII - 86





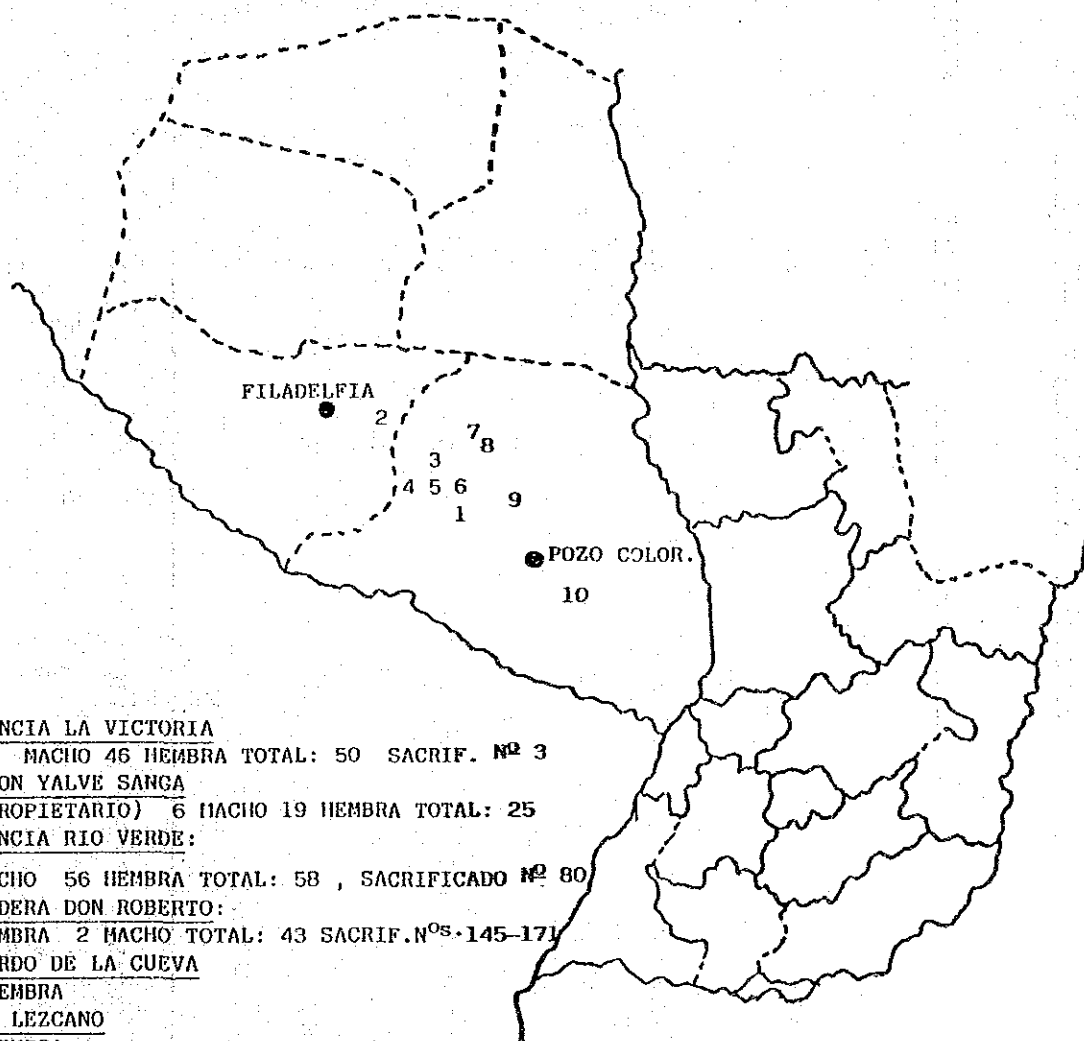


ESTUDIO DE INCIDENCIA DE BRUCELOSIS EN CABRAS

UBICACION DE LOS ESTABLECIMIENTOS

EN ESTUDIO

FECHA: 5 - VIII - 86 AL 8 - VIII - 86



1. ESTANCIA LA VICTORIA  
4 MACHO 46 HEMBRA TOTAL: 50 SACRIF. Nº 3
2. MISION YALVE SANGA  
10 PROPIETARIO) 6 MACHO 19 HEMBRA TOTAL: 25
3. ESTANCIA RIO VERDE:  
2 MACHO 56 HEMBRA TOTAL: 58 , SACRIFICADO Nº 80
4. GANADERA DON ROBERTO:  
41HEMBRA 2 MACHO TOTAL: 43 SACRIF.Nºs-145-171
5. RICARDO DE LA CUEVA  
18 HEMBRA
6. JUAN LEZCANO  
19 HEMBRA
7. ALBERTO ALBARENGA OCAMPOS  
1 MACHO 11 HEMBRA TOTAL: 12
8. VLENTIN AYALA  
2 MACHO 5 HEMBRA TOTAL: 7
9. EVARISTO BLANCO  
2 MACHO 15 HEMBRA TOTAL: 17
10. ELENA TORRES DE ZARACHO  
1 MACHO 10 HEMBRA

RESULTADOS DE PRUEBAS DE BRUCELLOSIS EN CAPRINOS

<u>ESTANCIA</u>	<u>TOTAL DE CAREZAS</u>	<u>MACHO</u>	<u>HEMRA</u>	<u>SOSPECHOSO (%)</u>	<u>POSITIVO (%)</u>
1.- LA VISTORIA	50	4	46	2 (.4%)	3 (6%)
2.- MISION YALVA SANGA	25	6	19	0	0
3.- RIO VERDE	58	2	56	0	0
4.- GANADERA DON ROBERTO	43	2	41	0	3 (7%)
5.- RICARDO DE LA CUEVA	18	-	18	0	0
6.- JUAN LEZCANO	17	-	17	0	0
7.- ALBERTO ALBARENGA OCAMPOS	12	1	11	0	0
8.- VALENTIN AYALA	7	2	5	0	0
9.- EVARISTO BLANCO	17	2	15	0	0
10.- ELENA TORRES DE ZARACHO	11	1	10	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>258</b>	<b>30</b>	<b>228</b>	<b>2 (0.8%)</b>	<b>6 (2.3%)</b>

CARACTERISTICAS DE LA CEPA AISLADA  
 MORFOLOGIA DE LAS COLONIAS: REDONDAS, LISAS, TRANSLUCIDAS 0,5-1  
 MM DE DIAMETRO BLANCO AMARILLENTAS

TINCION DE GRAM: COCOBACILOS GRAM -- NEGATIVOS

	CEPA AISLADA	CEPA DE REFERENCIA BRUC. MELIT, M16 (BIOT.1)	CEPA DE REFERENCIA BRUC. ABORTUS 544 (BIOT. 1)
- TEMPERATURA DE CREC.	37°C	37°C	37°C
- REQUERIMIENTO DE CO <sub>2</sub>	-	-	+
- MOTILIDAD	-	-	-
- O.F TEST	-	-	-
- PRODUCCION DE CATALASA	+	+	+
- PRODUCCION DE OXIDASA	+	+	+
- PRODUCCION DE H <sub>2</sub> S	-	-	+
- AGRIFLAVINE TEST-AGLUTIN	-	-	-
- UREASA TEST	+	+	-
- AGLUTINAC. CON SUERO ANTBRUC. LISAS	+	+	+
- SUERO ANTBRUC. RUGOSAS	-	-	-
-REQUER. DE SUE-RO P/SU CREC.	-	-	-
--CREC. EN PRESEN- CIA DE COLORAN- TE			
1 - TIONINA 1:600	-	-	+
2 - FUCSINA BASICA 1:200	-	-	-
- AGLUTINACION CON SUERO MONOESPE.			
ANTI - M	+	+	-
ANTI - A	-	-	+
- LISIS POR FAGOS EN RTD			
TB	NL	NL	L
WB	NL	NL	L
- HUESPED	CABRA	CABRA, OVEJA	BOVINO



PRUEBAS BACTERIOLÓGICAS

Nº 171 DE CABRAS

MUESTRAS: Sangre - Leche - Hígado - Bazo - Ganglios - Exudado Vaginal

COLONIAS AISLADAS: De ganglios y Exudado Vaginal

MEDIOS DE CULTIVO: SDTSA y medio de Farrell (Suero Dextrose - Tripl. Soy Agar)

TEMPERATURA DE INCUBACIÓN 37°C

- 1.- CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS: redondas, lisas, translúcidas, 0.5 - 1 mm. de diámetro (3 días) - Gram - negativas
- 2.- En medio de SIM (sulfide Indal Motility Medium) :
  - a - Test de Movilidad: Negativo
  - b - Producción de H<sub>2</sub>S: Negativo
- 3.- TEST DE CRECIMIENTO: con 10% CO<sub>2</sub> --- + Positivo  
sin CO<sub>2</sub> .. + Positivo
- 4.- CATALASA: Positivo
- 5.- OXIDASA : Positivo
- 6.- O - F Test (Hugh - Leifson Medium) - Negativo
- 7.- PRUEBAS DE AGLUTINACION EN PORTAOBJETOS:  
Con Suero Anti Brucella abortus : +  
Anti Brucella melitensis: +  
Anti Brucella Canis : -  
Anti Brucella Ovis : -
- 8.- ACRIFLAVINE TEST - Negativo
- 9.- CRECIMIENTO C/ COLORANTES:  
Tiras impregnadas con TIONINA al 1:600 --- + Negativo  
Tiras impregnadas con Fucsina Básica al 1:200 → Positivo
- 10.- AGLUTINACION EN PORTAOBJETOS CON:  
ANTISUERO MONOESPECIFICO: A Negativo  
" " : M Positivo

OBS: BRUCELA MELITENSIS BIOTIPO I

### ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE LA BRUCELOSIS EN CABRAS

En las pruebas serológicas realizados en 10 establecimientos de la Región Occidental; 2 de ellos se han identificado como rebaños reactivos. Se han sacrificado las cabras con reacción positiva y las muestras colectadas en autopsias, han sido inoculadas en los diferentes medios de cultivos indicados para el aislamiento de Brucelas obteniéndose el siguiente resultado: de los materiales obtenidas la cabra identificada con el N<sup>o</sup> 171 y perteneciente a Ganadera Don Roberto ubicada en la localidad de Tte. Zenteno, Dpto. de Pdté. Hayes (Chaco Paraguayo) se ha aislado Brucela Melitensis

Nombre del Establecimiento: Ganadera Don Roberto

Departamento: Pdte. Hayes

Localidad: Tte. Zenteno

Especie Animal: Caprina

Población de cabras en el Establecimiento: 70

Fecha de Recolección de las Muestras: 5 - VIII - 86

Cabra N<sup>o</sup> 171 - Sexo - Hembra

Resultados Serológicos:

Placa: 1/100

Tubo: 1/200

2 ME : 1/200

C T : Positivo

Obs: Hay antecedentes de abortos de cabras en el establecimiento.

## ESTUDIO DE INCIDENCIA DE BRUCELLOSIS EN CABRA

### SISTEMA DE EXPLOTACION

El objetivo de la explotación caprina de los productores visitados es la producción de carne para auto consumo, no se realizan ordeñe, el sistema de explotación es extensiva en todos ellos, existiendo algunas variaciones en el manejo, sanitarización y razas explotadas.

El manejo diario consiste en el encierre diario de los animales, en reducidos corrales, al atardecer y largada al día siguiente entre las 9 y 10 hs. existiendo apilamiento y mucho contacto entre sí, por muchas horas al día.

- 1.- ESTANCIA VICTORIA: La raza explotada es la criolla con alto porcentaje de mestizos toggenburg. El plan de sanitarización consiste en: Vacunación anti-aftosa, oleosa, anual; desparasitación cada 3 meses; en 1982 se ha realizado un control serológico encontrándose reaccionantes positivos para brucelosis, desde esa fecha se separan todos los cabrillos al destete.
- 2.- MISION YALVE SANGA: La raza explotada es la criolla. Algunos propietarios de esta aldea realizan encierre diario de los animales en corrales, otros que tienen poca cantidad, utilizan el sistema de cría en estacas. No existe ningún plan de sanitarización.
- 3.- ESTANCIA RIO VERDE: La característica racial que se observa en esta estancia corresponde a mestizos Anglo-Nubia.  
Manejo: Encierre diario en corral; Sanitarización: Realizan desparasitación en forma esporádica.
- 4.- GANADERA DON ROBERTO: Característicos de los animales, mestizo Anglo-Nubia, Manejo: Encierre diario; Sanitarización: vacunación anti-aftosa y desparasitación. Se tiene antecedentes de abortos.
- 5.- RICARDO CUEVA:
- 6.- JUAN LESCANO: En estos dos establecimientos los animales son criollos, realizan encierre diario, desparasitaciones esporádicas.
- 7.- ALBERTO ALBARENGA OCAMPOS:
- 8.- VALENTIN AYALA: Las características raciales observados en los animales de estos lugares son bastante definidas y corresponden a la raza Anglo-Nubia. Realizan manejos muy similares con encierre diario de los animales. No tienen ningún plan sanitario.

- { 9.- EVARISTO BLANCO:
- { 10.- ELENA TORRES DE ZARACHO: Cuentan con cabras criollas, realizan encie-  
rre diario, no realizan ninguna sanitación a los animales.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCION  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

TRABAJO DE MICROBIOLOGIA DE LA MASTITIS

EN LA CUENCA LECHERA DEL PAIS

NOVIEMBRE DE 1985 A JULIO DE 1986  
Y DE JULIO DE 1986 A NOVIEMBRE DE 1986

RESPONSABLES:

Dr. Shigeo Nishino

Dr. Delonor Pifianez

Dra. Elena Enciso de Ayala

Dr. Miguel Angel Almada

PROYECTO DE MEJORAMIENTO DE LA REPRODUCCION ANIMAL

J.I.C.A.

Año 1.986

TECNICA UTILIZADA POR EL DR. KUME

(experto japonés)

PARA LA DETECCION DE MASTITIS

EN LA CUENCA LECHERA

DESDE EL MES DE OCTUBRE DEL 83

HASTA OCTUBRE DEL 86

SENSIBILIDAD DE GERMENES DE LA MASTITIS A LOS ANTIBIOTICOS

	<u>MUY SENSIBLE</u>	<u>SENSIBLE</u>	<u>LEG. SENSIBLE</u>	<u>RESISTENTE</u>
FOSFAMICINA	1			12
AMPICILINA	2	2		9
CEPHAROLIDIN	1	1	2	9
DIBEKACINA			3	10
GENTAMICINA	3	4	3	3
DULFISOMIDIN			1	12
MINOCICLINA		2	1	10
NOVOVICIN		2		11
FURAZOLIDONA	1	2		10
LYNCOMICINA		1		12
PENICILINA		2	1	10
TETRACICLINA	1	1	3	8
STREPTOMICINA			2	11
POLYMXIN B	1			12
POXICICLINA		1	1	11
T. GENERAL	10	18	17	150

TEST DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS

CASO	FECHA	MUESTRA	RAZA	LOCALIDAD	BACTERIAS AISLADAS	M.S.			Resistente			Observación
						Fo-	Pb-	S	L.S	Pb-	S	
1	22-XI-85	leche	H	S. Lorenzo	Streptoc.	Fo-	Pb-		Gr-Gn	DKb	DKb-Xp-D-Mro-N-F-L-P-T-ST-Dct	1- Fo= Fosfomicina
2	3-XII-85	"	H	"	Stafiloc	Pb-Cr			Dct		Gn-D-Xp-N-Mro-F-L-sf-T-Fo-Cr	2- Pb= Ampicilina
3	4-XII-85	"	H	Villeta	Stafiloc		N-Mro		Cr-Gn		Fo-DKb-D-Mro-F-L-P-ST-Xp-Dct	3- Cr= Ceftarolidin
4	23-XII-85	"	H	M.P. Alorzo	Stafiloc		Po-N		Mro		Gn-D-DXb-F-L-P-ST-Xp-Dct-T-Cr-Fo-Pb	4- DKb= Dibececina
5	28-XII-85	"	M	S. Lorenzo	Coryneb.	T-Xp			Gn		DKb-Xp-D-Mro-N-F-L-P-ST-Dct-Pb-Fo	5- Gn= Gentamicina
6	6-I-86	"	H	"	Stafiloc	Gn	Dct				Xp-DKb-D-Mro-N-L-P-T-ST-F-Cr-Fo-Pb	6- D= Dulfisonidín
7	10-II-86	"	H	Caplatá	Coryneb		P-T-Cr				DKb-Xp-D-Mro-N-F-L-Pb-ST-Dct-Fo	7- Mro= Minociclina
8	12-III-86	"	H	Na. Italia	Stafiloc	Gn-Pb	Mro-F		D-Dkb		Xp-N-L-P-T-ST-Dct-Fo-Cr	8- R= Nevoibocin
9	20-VI-86	"	H	Aregua	Stafiloc		Gn		T-Dkb		Mro-Xp-N-L-P-ST-D-Dct-F-Fo-Cr-ST	9- f= Frazolidina
10	26-VI-86	"	H	S. Lorenzo	Stafiloc		F-Gn		T		Mro-Xp-N-L-P-ST-D-Dct-Fo-Cr-ST-Pb	10- L= Lincomicina
11	2-VII-86	"	P.S	"	Stafiloc		Gn-L		T-ST-P		Mro-Xp-N-L-ST-D-Dct-F-Fo-Cr	11- F= Penicilina
12	9-VII-86	"	H	"	Stafiloc	F	Gn-P		ST		Mro-Xp-N-L-D-Dct-Fo-Cr-Pb-Dkb	12- T= Tetraciclina
13	11-VII-86	"	P.S	"	Streptoc	Gn					Mro-Xp-N-L-D-Dct-F-Fo-Cr-Pb-Dkb-T-P-ST	13- ST= Streptomicina
												14- Xp= Polymixin-B
												15- Dct= Doxiciclina



METODO MODIFICADO POR EL DR. SHIGEO NISHINO

(experto japonés)

ESTA TECNICA MODIFICADA ES LA QUE ACTUALMENTE SE

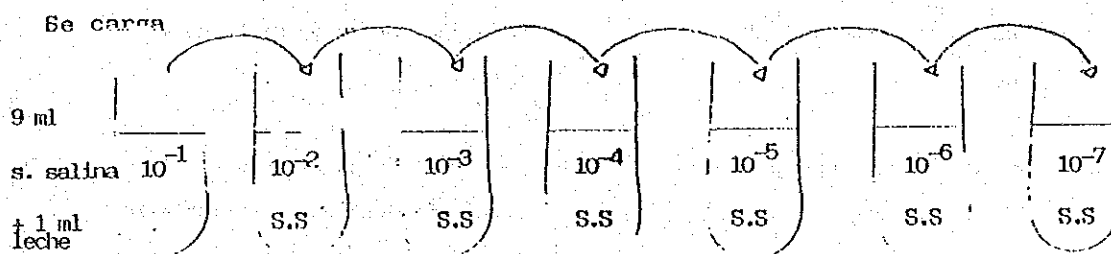
SIGUE EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

DESDE EL 17 - VII - 86

En el laboratorio de Microbiología a partir del día 17 - VII - 86 he<sup>g</sup>nes  
 hecho una <sup>mo</sup> modificación con el método anterior para determinar tipos de  
 bacterias que atacan en la Mastitis y contar los tipos de colonias X ml.  
 Una vez terminado esto se procede a hacer el antibiograma.

PASOS DEL METODO MODIFICADO

1) Se hace diluciones sucesivas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  esto depende del aspecto  
 de la leche problema.

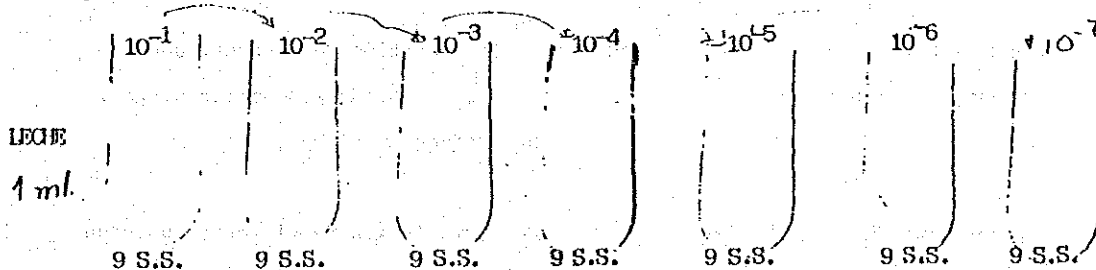


2) De cada dilución se deposita 0.1 ml en una placa con medio de cultivo  
 BHI + AGAR - Cada placa llevará escrita la dilución a la cual pertenece,  
 una vez terminada la siembra que se hace con la varilla de vidrio,  
 tratando de cubrir completamente la placa.

3) Luego se lleva a la estufa a 37° C durante 24 horas.

4) De estas placas se eligen tres; en las cuales las colonias se pueden  
 contar.

Ejemplo: Dilución



Observación: S.S. solución salina

Una vez contadas las colonias se multiplican X 10 que es la dilución,  
 se eleva a la potencia a la cual corresponde la dilución Ej.

32 colonias en la dilución  $10^{-3}$  esto se multiplica por la dilución  
 $32 \times 10 = 320$  esto se eleva a la potencia  $10^{-3}$  y tenemos  $320 \times 10^3 =$   
 $3.200 / ml$  o sea  $3.2 \times 10^{-5} / ml$

5) Terminado esto se procede a hacer frotis de una de las colonias para  
 hacer la coloración de Gram sea se hace el sgte. cuadro.

NUESTRA      GRAM      - OX      CAT      TSI      SIM      O/F      INDOL

GRAM = Para determinar si es gram (+) o gram (-)

OX= Para determinar osidaza + o -

CAT= Para determinar CATALAZA + o -

TSI= Triple Sugar Iron (triple azucar hierro)

INTERPRETACION

REACCION

1. Fondo ácido, superficie ácida  
GAS en el fondo sin color  
negro

Fermentación de glucosa, o lactosa con formación de ácido y gas.

2. Fondo ácido, superficie alcalina, variable en gas, color negro en fondo

Fermentación de glucosa con la formación de ácido y variable en gas. SACAROSA y lactosa no fermentadas. Producción de H<sub>2</sub>S.

3. Fondo ácido, superficie alcalina  
Variable en gas, sin color negro

Fermentación de glucosa con la formación de gas. SACAROSA Y LACTOSA no fermentadas. No producción de H<sub>2</sub>S

4. Fondo ácido, superficie ácida, variable en gas color negro.

Fermentación de glucosa, sacarosa, o lactosa con formación de ácido y variable en gas. Producción H<sub>2</sub>S.

5. Fondo alcalino, superficie alcalina  
No gas, sin color negro

No fermentación de glucosa, sacarosa o lactosa. No producción de gas. No producción de H<sub>2</sub>S.

6. Fondo ácido, superficie ácido, no gas, sin color negro.

No fermentación de glucosa, sacarosa o lactosa con formación solamente de ácido. No gas. Variable en la producción de H<sub>2</sub>S.

SIM= Acido sulfurico, Indol y movilidad. Esto sirve para la detección de acido sulfurico, producción de Indol y movilidad de las bacterias.

PRUEBA: Acido sulfurico - negro.

Indol: color negro cuando se agrega el reactivo de Kovacs

Movilidad: opacidad del medio

Negativo; color amarillo claro

O/F.: Oxidación - Fermentación

PRUEBA: Amarillo en el tubo abierto - Oxidación

Amarillo en el tubo cubierto o ambos - Fermentación

Verde o azul - no oxidación - no fermentación

SENSIBILIDAD DE GERMESES DE LA MASTITIS A LOS ANTIBIOTICOS

	<u>MUY SENSIBLE</u>	<u>SENSIBLE</u>	<u>LEG. SENSIBLE</u>	<u>RESISTENTE</u>
TETRACICLINA	9	8	-	4
FURAZOLIDONA	7	5	-	6
PENICILINA	2	3	4	15
CLOROMICETINA	2	-	2	17
GENTAMICINA	1	13	4	5
STREPTOMICINA	1	5	1	6
<b>T. GENERAL</b>	<b>22</b>	<b>34</b>	<b>11</b>	<b>53</b>

Nº casos	FECHA	MUESTRA	ESPECIE	RAZA	LOCALIDAD	BACTERIAS AISLADAS	TEST DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS				OBSERVACION
							NOY SENSIBLE	SENSIBLE	LIGER.	SENSIBLE RESISTENTES	
1	17-VII-86	leche	Bovina	H	C. Grande	Ech. coli	T	P	F-Cl-G <sup>5</sup>	$1.04 \times 10^5$ /ml	P-Penicilina
2	21-VII-86	"	"	P.S	S. Lorenzo	Ech. Coli	ST-P-G			$9 \times 10^3$ /ml	G-Gentamicina
3	21-VII-86	"	"	H	"	Stafilo	T		ST-F-G	$5.1 \times 10^3$ /ml	Cl-cloromicetina
4	21-VII-86	"	"	H	Capiata	Enterob	T-ST	P-Cl	G	$9.8 \times 10^2$ /ml	F-Furazolidona
5	21-VII-86	"	"	H	Ita Errama	Enterob	F	P-G	Cl-T	$7.7 \times 10^3$ /ml	ST-streptomycina
6	21-VII-86	"	"	H	"	Acinetob	F-I	G	Cl-P	$1.7 \times 10^4$ /ml	T-Tetraciclina
7	21-VII-86	"	"	H	"	Acinetob	F-P	ST-G	Cl	$8 \times 10^4$ /ml	
8	24-VII-86	"	"	H	Caaguazú	Enterob	T-F	ST-P		$6.5 \times 10^4$ /ml	
9	11-VIII-86	"	"	H	C. Grande	Stafilo	T		Cl-G-P-ST	$9.2 \times 10^6$ /ml	
10	12-VIII-86	"	"	P.S	S. Lorenzo	Stafilo	F-I	G-P	Cl	$3 \times 10^7$ /ml	
11	25-VIII-86	"	"	M	"	Stafilo	T	G-ST	Cl-P	$3.3 \times 10^5$ /ml	
12	25-VIII-86	"	"	H	Capiata	Strepto	F-G	F-G	Cl-POST	$8 \times 10^5$ /ml	
13	9-IX-86	"	"	P.S	Aregua	Micrococ	T	F-G	Cl-P	$3.2 \times 10^4$ /ml	
14	9-IX-86	"	"	H	S. Lorenzo	Coryneb	T-ST	G	Cl-P	$9.3 \times 10^6$ /ml	
15	9-IX-86	"	"	H	"	Micrococ	Cl	T-G	P-ST	$2.2 \times 10^4$ /ml	
16	12-IX-86	"	"	H	"	Coryneb	G	G	P-Cl-T-ST	$5.6 \times 10^4$ /ml	
17	15-IX-86	"	"	P.S	"	Coryneb	Cl	Cl	P-ST-F	$2.6 \times 10^5$ /ml	
18	15-IX-86	"	"	H	"	Coryneb	F-P	T-F-G	P-Cl	$2.9 \times 10^5$ /ml	
19	25-IX-86	"	"	H	"	Lactobac	P-T	P-T	Cl-F-G	$1.3 \times 10^5$ /ml	
20	26-IX-86	"	"	P.S	"	Stafilo	T	ST	P-Cl-F	$1.9 \times 10^6$ /ml	
21	30-IX-86	"	"	H	"	Coryneb	F	F-G	Cl-P-T	$4.2 \times 10^5$ /ml	
22	30-IX-86	"	"	P.S	"	Micrococ	F	G	T-Cl-P	$2.1 \times 10^5$ /ml	
23	1-X-86	"	"	P.S	"	Acinetob	F	T	Cl-P	$1.1 \times 10^6$ /ml	
24	9-X-86	"	"	H	"	Micrococ	Cl	T	P-F	$2.2 \times 10^5$ /ml	

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCION  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
SERVICIO NACIONAL DE SALUD ANIMAL

- LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
- DIVISION BRUCELOSIS

Diagnóstico de Brucelosis, Campylobacteriosis y Trichomoniasis en animales  
utilizados en el Proyecto.

Octubre de 1985 a Noviembre de 1986

PARTICIPANTES:

L. Microbiología

Dr. Miguel Angel Almada

Dra. Elena Enciso de Ayala

L. Parasitología

Dr. Antonio Rodrigues Sanchez

Dra. Estela Maciel

D. Brucelosis

Dr. Julio Rubén Brambilla

EXPERTO:

Dr. Shigeo Nishino

PROYECTO DE MEJORAMIENTO DE LA REPRODUCCION ANIMAL

J.I.C.A.

ESTABLECIMIENTOS UTILIZADOS PARA TRABAJOS TECNICOS DENTRO DEL PROYECTO

RESULTADO DE ANALISIS DE BRUCELA

CAMPYLOBACTER Y TRICHOMONIASIS

ESTANCIA	BOVINO		TRICHOMONIASIS	CAMPYLOBACTER	BRUCELOSIS
	HEMERA	MACHO			
QUIQUIYO (SENACSA)	13	-	0	0	0
TAMBO MODERNO (F.C.V.)	-	-	0	1	0
TAMBO RUSTICO (F.C.V.)	-	-	0	0	0
	13				

ESTABLECIMIENTO UTILIZADOS PARA TRABAJOS TECNICOS FUERA DEL PROYECTO

ESTANCIA VACA RETA	-	-	-	-	0
	11				



RESULTADO DE ANALISIS DE BRUCELA

ESTANCIA DEMOSTRATIVO	BOVINO		TRICHOMONIASIS		CAMPYLOBACTER		BRUCELOSIS POSITIVO SOSPECHOSO
	HEMERA	MACHO	CAMPYLOBACTER	TRICHOMONIASIS	CAMPYLOBACTER	TRICHOMONIASIS	
CORDILLERITA	16	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	1
POZO AZUL	52	3	12	0	6	3	0
	47	0	2	0	6	0	0
LOMA GUAZU	30	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0
PINDORA	15	0	0	0	0	0	0
SANTA CARMEN	4	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	4
BUENA VISTA	30	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0
PIRIPUCU	29	0	0	0	0	0	0
	31	0	0	0	0	0	0
CABAÑA GUAVIRAY	-	-	-	-	-	-	-
CABAÑA EL RINCON	-	0	0	0	0	0	0
	11	-	-	-	-	-	-

RESULTADO DE ANALISIS DE BRUCELA

CAMPYLOBACTER Y TRICHOMONIASIS

ESTANCIA DEMOSTRATIVO	BOVINO		TRICHOMONIASIS	CAMPYLOBACTER	BRUCELOSIS POSITIVO SOSPECHOSO
	HEMERA	MACHO			
ESTANCIA EL RINCON	-	-	3	3	7
	110				1
ESTANCIA BUENA VISTA DE CHACO	50		0	0	0
	116		0	0	1
			0	0	6
	0		0	0	0
TOTAL GENERAL	251	3	3	12	6
	420	3	5	14	12



担当分野：家畜繁殖（受精卵移植）

氏名：小島敏之

派遣期間：昭和60年9月27日～昭和61年10月26日



## 目 次

専門家業務総合報告書 .....	310
パラグアイにおける牛の受精卵移植に関する報告書（西語一部英語） .....	356
家畜繁殖改善計画（西語） .....	407

専門家業務総合報告書

パラグアイ家畜繁殖改善計画

家畜繁殖分野、受精卵移植担当

小 島 敏 之

農 林 水 産 省 畜 産 試 験 場

繁殖部生殖細胞移植研究室

派遣期間

1985年9月27日～1986年10月26日

# 目 次

1. 要 約 .....	342
2. 技術協力計画 .....	342
2.1 目標の設定とその背景 .....	342
2.2 協力計画内容 .....	342
2.3 協力手段および手法の設定 .....	342
3. 技術協力の推移 .....	343
3.1 日本側のインプット .....	343
3.2 パラグアイ側のインプット .....	343
4. 技術移転の実績、考察および評価 .....	343
4.1 技術の確立 .....	343
4.2 技術の普及・訓練 .....	343
4.3 技術の定着度 .....	344
4.4 直接効果 .....	344
4.5 波及効果 .....	344
5. 教訓および提言 .....	344
5.1 受入国の事情に関して .....	344
5.2 協力体制に関して .....	344
5.3 技術分野に関して .....	344
5.4 その他 .....	345
6. 試験成績および考察 .....	345
7. カウンターパート氏名 .....	346
8. おわりに .....	347

附 録 試験成績



## 1. 要 約

パラグアイ家畜繁殖改善プロジェクトの第三年次終盤から第四年次終盤にかけて、国立アスンシオン大学獣医学部家畜繁殖学科受精卵移植研究室の構成員4名に受精卵移植技術(以下、ET技術と略称する)の移転を行った。第一年次から第三年次前半において、他の日本人専門家によるET技術の紹介段階は終了していた。小職が赴任した当時、牛のETの実際について総合的な視点で業務を遂行できる人材が居なかったため、小職の任務は彼らへのET技術の移転を通しての人材養成であると判断した。同学部、二カ所の演示牧場および一カ所の試験牧場の牛群を利用してのET作業において、採卵・移植計画の立案、牧場側との交渉、器具・メediumの諸準備、結果のとりまとめ等を彼ら自身に体験させた。また、その過程で彼らに欠けていると思われた *in vitro* での受精卵の操作技術と凍結・融解技術を伝達した。現在各人がETの各行程を理解しながら遂行できる程度に、彼らのETに関する知識・技術水準は向上しているものと評価できる。

パラグアイでは、一般に晩春から夏にかけて(10月から翌年2月頃まで)の数カ月間だけが肉牛の繁殖季節と限られているので、非繁殖季節には同学部家兎生産室の家兎を使用して採卵・移植および凍結保存の実験を行い、とくに *in vitro* での受精卵の操作技術の習熟を計った。第四年次終盤から第五年次は、後任の専門家(遠藤健治氏)が小職と同一の認識に立って、アメリカ合衆国等で培った知識・技術・経験を生かして、彼らの技術の一層の向上を計るべく活動を開始している。

## 2. 技術協力計画

### 2.1 目標の設定とその背景

小職が赴任した当時、牛のETの実際について、行程全体を把握しながら、各行程を確実に遂行できる人材が居なかったため、小職の任務は、ET研究室の構成員4名にETの全行程を体験させ、その過程で必要な指導・助言をすることを基本姿勢にした。一方、パラグアイに適したET技術とその周辺技術を模索し開発することを心がけた。

### 2.2 協力計画内容

大筋は、実行計画表の通りである。

### 2.3 協力手段および手法の設定

獣医学部酪農施設、二カ所の演示牧場(サンタ・カルメン牧場とポソ・アスール牧場)および一カ所の試験牧場(SENACSAのクオオ牧場)の牛群を利用してのET作業において、カウンターパート(ET研究室の構成員)自身に、採卵・移植計画の立案、牧場側との交渉、器具・メediumの諸準備、結果のとりまとめ等を体験させた。また、その過程で彼らに欠けていると判断された *in vitro* での受精卵の操作技術と凍結・融解技術を伝達した。肉牛の

非繁殖季節には、家兔の受精卵を利用して受精卵の in vitro での操作技術および凍結・融解技術の習熟を計った。

### 3. 技術協力の推移

#### 3.1 日本側のインプット

受精卵移植関係

長期専門家の派遣

機材供与

研修員の受入れ

Dr. Roberto Cajés Moran

福島種畜牧場等 3 カ月間

#### 3.2 パラグアイ側のインプット

E T 研究室へのカウンターパートの配属（4 名中 3 名は全日勤務、他 1 名は半日勤務）

動物利用に関する便宜

獣医学部酪農施設－供卵牛

ククオ牧場－受卵牛

サンタ・カルメン牧場－供・受卵牛

ポソ・アスール牧場－供・受卵牛

### 4. 技術移転の実績、考察および評価

#### 4.1 技術の確立

この分野では、依然、既製の E T 技術の移転段階であるので、パラグアイでの野外応用を想定した E T 技術およびその周辺技術の模索・確立の試みは緒についたばかりである。

基本的な機材が揃っている現段階では、採卵・移植技術および実験室内作業については既製の技術を導入しても問題はないと考えた。ただし、その際、最新情報を収集する工夫を行い、カウンターパートが様々な方法の中からパラグアイに適している方法を選択できる余地を残しておくようにした。その他の行程については、パラグアイの経済状態および肉牛飼養形態を考慮して、パラグアイに適した E T 技術を開発しなければならない。すなわち、一般に E T は、非常に高価につくので、パラグアイにおいて将来的に E T 技術が定着するためには、でき得るだけ安価にする工夫が必要であろう。

#### 4.2 技術の普及・訓練

E T 分野での技術協力の目的は、カウンターパートを将来のパラグアイにおける E T の指導者として養成することであり、彼ら自身に E T の全行程を体験させるという基本姿勢を前

提にした技術移転を通じて、訓練を重ねた。その他、年1回行なわれている繁殖生理、繁殖病理および人工受精についての講習会の中で、カウンターパートによる計2週間のET技術の講義・実習を通して、現場で働く中堅獣医師に対してその普及・訓練を行った。パラグアイにおいて、ET技術の応用の場のひとつは、肉牛純粋種繁殖経営農家であり、それらの演示牧場の供卵牛、受卵牛を用いてETを実施し、その知識の普及を計った。

#### 4.3 技術の定着度

現在、技術移転の途上であるので、定着度を判定するのは困難であるが、カウンターパート自身が全ての行程をこなせる段階に達しているので、プロジェクト終了後も経済的裏づけおよび需要があれば、定着する可能性は大きいと考えられる。なお、今年から隣国ブラジルおよびアルゼンチンのET会社が、パラグアイに進出を開始したことを附記しておく。

#### 4.4 直接効果

ETの利点は、雄畜の側からだけでなく、雌畜の側からも形質の改良を計れること、および一時に複数の全兄弟を得れることである。ただし、得られた子畜の全てが、親よりも優秀であるとは限らないので、全兄弟の中から選抜しなければならない。これらの利点を最大限に利用して、選抜された雄子畜は巻牛候補に、雌子畜は将来の供卵牛候補とすれば改良速度は早まるであろう。

#### 4.5 波及効果

ETが浸透することによって、その周辺技術である発情発見方法、性周期の同期化方法あるいは牛飼養方法の改良・改善が進み、人工授精の普及率向上に貢献するものと思われる。

### 5. 教訓および提言

#### 5.1 受入国の事情に関して

牛群の育種改良に果す効力は、人工授精の方がETに比べて大きいですが、パラグアイでは人工授精の普及率は依然として低い。したがって、パラグアイ側は人工授精を補完する意味で牛群の育種改良の手段としてETに期待をかけている。

#### 5.2 協力体制に関して

パラグアイ側のプロジェクト責任者である獣医学部長がETに関する試験に力を入れているので、実施する側としては牧場の協力を得るうえで非常に好都合である。

#### 5.3 技術分野に関して

プロジェクト開始以来、現在まで基本的なET技術および凍結保存技術の移転を行ってきた。今年度機材要求において、マイクロ・マニピュレーターを要求した。受精卵の分割は、貴重な受精卵の数を殖やす意味で有用な技術である。後任の遠藤専門家は、分割の技術を持っているので、技術移転に関しては問題はないと考えられる。

人工授精の普及を妨げている要因のひとつは、連日の発情発見および発情牛を捕獲場所まで誘導する手間とわずらわしさである。ETにおいても、発情発見の重要性は人工授精におけるのと同様であり、確実に安価で省力的な発情発見法の導入などETの周辺技術の充実を計る必要がある。将来的には、パラグアイにおけるETの経済効果を判定する作業およびパラグアイにおけるETの運用方法に関しての技術協力が考えられる。パラグアイでは、一般のコマーシャル肉牛の大半は、ゼブー・クリオーリョ・ヨーロッパ種の種々の交雑程度の雑種で構成されているが、ETで生産された雄牛を巻牛として利用する場合、それらの最適交雑割合を知ることが必要であり、この分野への技術協力も考えられる。

#### 5.4 その他

その周辺技術も含めて日進月歩に改良が進められており、そのうえ費用のかさむET技術を開発途上国に導入し、その技術移転を計ろうとしても、情報の収集および試薬・機材の調達が途上国では困難であるので、新技術の定着・発展は非常にむずかしい。残念ながら、パラグアイもその例外ではないと思う。情報の提供等では、協力を惜しまないが、パラグアイ側の努力、カウンターパートの奮起に期待するしかないと思う。畜産先進国であるので、基礎的な繁殖技術の水準は高く、供卵牛と受卵牛の価格差も十分にあり、ETが実用化される素地はあると考えられる。技術の普及のためには、組織作りも併行して行うのが理想的で、例えばセンターで供卵牛・受卵牛を集中管理する方式がパラグアイには適しているかも知れない。

#### 6. 試験成績および考察

野外でETを実施するにあたっての知見を得るために演習牧場二カ所計4頭の牛に過剰排卵処置を施した。過剰排卵処置・人工授精・1日2回の発情監視は全て牧場側に依頼するシステムとした。カウンターパートの訓練および野外でETを成功させるための条件さがしを目標にした。過剰排卵処置方法・FSHロット・PG投与方法・人工授精回数などは斉一の条件で行った。演習牧場での採卵・移植当日には、ET用ラボラトリー車を使用した。採卵・移植場所から至近距離に無塵の空間が得られるので、利用価値は十分にあった。ただし、狭すぎる、悪路での走行不可能など改善点がいくつか見いだされた。獣医学部酪農施設のブラウンスイス種については、過剰排卵処置等はカウンターパート自身に行わせた。供卵牛として、リピーターブリーダーを使用してその原因を探る方法について指導したり、自然排卵を利用した1個採卵の方法を伝達するなど、繁殖病理および繁殖生理研究の手段としてETが応用できることを指導した。1個採卵の方法は、高価なホルモン剤を使用せず、また供卵牛にダメージを与えない方法として、さらに毎周期反復できる方法として、パラグアイで十分活用できる方法だと思われる。卵回収の方法は、ひとつの方法に固執せず臨機応変に使い分けることを指導した。

過剰排卵の成績は、総体的に不良であった。実施頭数が非常に少なかったが、昨年度と同様、牛の飼養管理が悪い牧場（ボソ・アスール）では良好な成績は得られなかった。ただ、この原因が単純に飼養管理にあるのか否かは断言できない。品種による過剰排卵の反応の差は、この結果からは討論できない。しかし、一般に品種間の差は、同一品種間の個体差に比べてはるかに小さいと言われている。

ククオ牧場の受卵牛群の発情は、折からのミシオネス地方の大旱魃の影響を受け、草の成長が止まったために発情を示す牛が極端に減少したので、予定していた凍結受精卵の移植試験は、その一部しか実施できなかった。移植試験では、改めて受卵牛の二重の個体識別および雄牛との確実な隔離の必要性が痛感された。演示牧場では、新鮮卵の移植を優先した。サンタ・カルメン牧場において1頭の供卵牛から5個の移植可能卵が得られ、それを5頭の受卵牛に移植した結果、3頭が受胎した。

発情同期化試験では、PGF<sub>2</sub>αアナログ（エストラメイトとイリレン）の投与（1回）により高い同期化率を示した。1回のみ注射による発情同期化には、正確な直腸検査技術が要求された。ヨード剤による発情同期化の試みは、結果にバラツキが見られ、投与時期・投与量などの細かい検討が必要であることが示唆された。

野外（肉牛大規模経営農家）でETを始める際、まず必要なことは、供卵牛および受卵牛の選抜である。まず、一般外ぼう診査、外部生殖器の肉眼的診断、直腸検査による妊娠鑑定と内部生殖器の触診を実施し、異常が認められなかったものについて、カテーテルによる頸管通過試験によってその難易度を判定し、その難易度の高いものは除外した。通過したものについては、ヨード剤を注入した。さらに、トリコモナス・キャンピロバクターおよびブルセラ病の陽性牛も、牛群から除外した。われわれの経験では、用意された牛の約50%が、この選抜によって除外されている。この牛群の選抜は、供卵牛の場合、できうる限り過剰排卵の成功率を高めるために、受卵牛の場合、発情発見の精度を上げ、受胎率を向上させるために不可欠の行程であると思われる。この後、2回性周期が正常範囲内で反復されたのを確認して、使用する方針とした。

ETの場合、どうしても受精卵をin vitroに出す行程が加わり、それによる生存性の低下が考えられるので、通常の繁殖方式をとる場合よりも一層厳しい高水準の飼養・栄養条件が着床・受胎・その後の成長のために要求される。それゆえ、受卵牛群の管理の良し悪しが、ET成功のためのひとつの重要な鍵を握っている。

## 7. カウンターパート氏名

Prof. Dr. Roberto Cajés Moran

Dr. Cayetano Jiménez Mendosa

Dr. Luis Alberto Franco Saenz

Dr. Ignacio Caceres Caballero

(Dr. Cesar Prieto)

## 8. おわりに

ETの専門家として、1年1カ月の間パラグアイに滞在したが、自分の実力・指導力・語学力がもっとあれば、カウンターパートへの技術移転がさらに効率よく進み成果も上げられたのではなかったかと考えると、日頃の日本における研鑽の大切さが再認識された。

農林水産省技術会議で、今後30歳台の研究員に技術協力が目的の長期派遣の機会を与えないと決定したそうであるが、年齢で制限することの無意味さには、どうも納得が行かない。かえって、若手の研究員の方が、柔軟性があり現地の状況を把握して、現地に適した技術協力ができると思う。なぜなら、日本の畜産技術がそのまま移転されるということはまず不可能なのであるから。小職の場合、技術協力を通して有形無形に多くのものを得ることができた。例えば、ET分野に限れば、あらゆる方面から供用する牛の選抜およびその牛の飼養管理方法の良し悪しの重要性を再認識する機会を得た。日本と全く正反対の形態をとる肉牛飼養を目のあたりにし、またその中で働く過程で、日本の畜産技術研究のあり方を再考することもできた。パラグアイ側との協同研究をまとめて発表する予定であり、今後もその協同研究を続けて行くようにしたい。技術会議の再考を強く希望するものである。

現地で任務を遂行するにあたって、御協力いただいたDr. Alberto Hideo Oka(家畜繁殖学科教授兼農牧省人工授精センター所長)、池田森男氏・小林一三氏・高橋潤一氏・西野重雄氏・西郷穂高氏・遠藤健治氏の各長期専門家の方々、堀川洋氏・馬原元生氏・久米新一氏の各短期専門家の方々、日系移住者のミゲール小原氏御夫妻、西島なぎさ嬢、山本麻沙子嬢、獣医学部長Prof. Dr. Eduardo Ruis Almadaを始めとする大学のスタッフの方々、SENACSA所長、Prof. Dr. Juan Pablo Romeroを始めとするSENACSAの職員の方々、人工授精センターの職員の方々、Dr. Vasquez 御夫妻(ククオ牧場)、Chichina嬢、Jacinta嬢、Margarita嬢、Alicia嬢、Dra. Raquel、戸田建設の本田氏御夫妻、スペース企画の小川氏、それに秘書のAna嬢に心から御礼申し上げます。ポソ・アスール牧場、サンタ・カルメン牧場およびブエナ・ビスタ牧場にも御協力および暖かいもてなしに対して感謝いたします。この貴重で有意義であった経験をする機会を与えていただいた関係者各位および派遣・1カ月の任期延長に際して種々の事務手続きをしていただいた関係者各位に深甚の謝意を表します。専門家の業務について、日本では国際協力事業団畜産開発課小野英男前課長、栗城俊之助課長、水野隆課員、銚之原節男課員に、パラグアイでは日本大使館高井書記官、国際協力事業団パラグアイ事務所業務二課の中島課長、大石課員に種々御教示いただきました。ここに厚く御礼を申し上げます。

過剩排卵の成績(I)

No.	Date of Coll.	排卵月日	Donor	GTH	PG	Superovulation	種雄牛	Ovary	Day after Estrus	Total No. Embryo	評価				non-fert.	Comments
											A	B	C	D		
1	3-XII-85	PS 21	FSH 5-4-3-2	Parasetal 20-10-10	26-XI-85	Duglas	CL 1-5	1-0	6.5	0	-	-	-	-	-	REPEAT BREEDER
2	"	PS 22	"	"	25-XI-85	Fbus	CL 5-7	0-0	7.5	8	-	-	8	-	-	
3	20-XII-85	PS 8206	"	"	24-12-12	"	CL 3-4	1-0	7.5	1	-	-	1	-	-	
4	17-I-86	PS 8206	Single	-	10-I-86	"	CL 1-0	0-0	7.0	0	-	-	-	-	-	
5	21-I-86	PS 22	"	-	14-I-86	"	CL 0-1	0-0	7.0	1	1	-	-	-	-	frozen
6	23-I-86	PS 19	"	-	16-I-86	Duglas	CL 0-1	0-1	7.0	0	-	-	-	-	-	
7	31-I-86	PS 6	FSH 5-4-3-2	24-12-12	24-I-86	Etus	CL 5-2	0-0	7.0	3	2	-	1	-	-	frozen
8	31-I-86	PS 18	"	"	23-I-86	M.N.	CL 3-7-8	1-0	7.5	11	8	2	1	-	-	ET & frozen
9	6-II-86	PS 8206	Single	-	30-I-86	Rerni	CL 0-1	0-0	7	0	-	-	-	-	-	
10	7-II-86	S. Carmen 8526 (NP)	FSH 5-4-3-2	24-12-12	31-I-86	frozen semen	CL 3-4 4-5	0-0	7	10	-	-	-	10	-	
11	19-II-86	P. Azul R222 (BP)	"	"	13-II-86	?	CL 5-7 3	0-0	6	0	-	-	-	-	-	
12	21-II-86	S. Carmen 8564 (NP)	"	"	14-II-86	Calcuta	CL 5-2	0-0	7	8	4	1	1	2	-	ET
13	28-II-86	PS 19	"	"	22,21-II-86	M.N.	CL 5-4	0-0	7-8	2	-	1	1	-	-	culture
14	—	P. Azul 8131 (BP)	"	"	no estrus	—	CL —	—	—	—	-	-	-	-	-	
									total	44	15	4	4	21		

表1、 過剰排卵の成績

	獣医学部	ボソ・アスール	サンタ・カルメン
供卵牛 (A)	6	2	2
発情を占した供卵牛 (B)	6	1	2
B/A (%)	100	50	100
卵が回収された供卵牛 (C)	5	0	2
C/A (%)	83	0	100
回収された総卵数 (D)	25	0	18
D/A	4.2	0	9
D/C	5	0	9
移植可能卵数 (E)	16	0	6
E/D (%)	64	0	33
E/A	2.7	0	3
E/C	3.2	0	3
品 種	ブラウン・スイス	ブラーマン	ネローレ



過剰排卵の成績(III)

RESUMEN DE LA RECOLECCIÓN DE EMBRIONES (superovulación)

	FCV	POZO AZUL	Sta. CARMEN	TOTAL 合計
Donadora (A)、 供卵牛 (A)	6	2	2	10
Donadora c/celo (B) 発精を示した供卵牛 (B)	6	1	2	9
B/A (%)	100	50	100	90
B/A (%)				
Donadora c/embriones (C) 卵が回収された供卵牛 (C)	5	0	2	7
C/A (%)	83	0	100	70
C/A (%)				
Total embrion (D) 総卵数 (D)	25	0	18	43
D/A	4.2	0	9	4.3
D/A				
D/C	5	0	9	6.1
D/C				
Embrion transferible (E) 移植可能卵数 (E)	15	0	6	21
E/D (%)	60	0	33	49
E/D (%)				
E/A	2.5	0	3	2.1
E/A				
E/C	3	0	3	3
E/C				
Raza、 品種	Pardo Suizo ブラウン・マイス	Brarman ブラーマン	Nelore ネローレ	

回収された卵子の評価  
CALIDAD DE EMBRIONES RECOLECTADOS

	F.C.V.	POZO AZUL	STA. CARMEN	合計 TOTAL
TRANSFERIBLE 移植可能	17	0	6	23
A	4	-	4	8
A'	7	-	0	7
B	3	-	1	4
C	3	-	1	4
INTRASFERIBLE 移植不能	9	-	12	21
D	9	-	12	21
DEGENERABLE 変性	0	-	0	0
INFERTIL 不受精	0	-	0	0
TOTAL 合計	26	0	18	44

発情同期化試験

RESULTADO DE SINCRONIZACION DE CELO

	F. C. V.		POZO AZUL		Sta. CARMEN		TOTAL	合計
	イリレン イリレン	ESTRAMATE エストラムイト	ESTRAMATE エストラムイト	ESTRAMATE エストラムイト	ESTRAMATE エストラムイト	ESTRAMATE エストラムイト		
VACAS INYECTADAS PG (A) PGを投与された牛 (A)	10	11	24	16	61			
VACAS QUE APARECIERON CELO (B) 発情を示した牛 (B)	9	8	20	16	53			
CELO (B/A)(%) 率 ( B / A )	90	73	83	100	87			
VACAS SINCRONIZADAS (C) 同期化された牛 (C)	8	8	18	16	50			
C/A (%)	80	73	75	100	82			
C/A (%)								

移植の成績(I)

移植月日 受卵牛 供卵牛との 左/右 形態 その他 備考 頸管 通過 難度 B T の方法 発情後の 日数 胚 No. 評価その他 妊産 移植者  
 Date of Recipient Asynchrony Side Mor. Other Comments Ease of Passing ET Method Day after Estrus Embryo STG GRD How By Preg.

No.	ET	Recipient	Asynchrony	Side	Mor.	Other Comments	Ease of Passing	ET	Method	Day after Estrus	Embryo STG	GRD	How By	Preg.
1	29-I-86	1782	0 (FG)	R	A'		- 2.5 mm		through cervix	7	MP0161 (Fro)	A'	CaJ	4/III
2	"	NEVADA W	0 (FG)	L	A'		- 3.0		"	7	PS 027 (Fro)	A	Jim	-
3	"	NEVADA V	-1 (FG)	R	A		- 3.0		"	6	PS 027 (Fro)	debris B	Fra	-
4	"	1722	0 (N)	L	A	expander no use	- 2.5		"	7	MP0161 (Fro)	B (str) A'	Cac	?
5	"	2332	0 (N)	R	B		- 3.0		"	7	MP0161 (Fro)	B (str) B	Ko	1/III
6	31-I-86	2272	+1 (FG)	R	B		- 2.5		"	8	PS 18	B	Fra	?
7	"	1611	0 (N)	R	A		- 2.5		"	7	PS 18	" A'	CaJ	?
8	"	1603	0 (N)	R	A		blood 3.0		"	7	PS 18	B A'	CaJ	-
9	"	2354	0 (N)	R	A				"	7	PS 18	B B	Fra	2/III
10	"	2350	0 (N)	R	?				"	7	PS 18	B A	Cac	+125/IV
11	21-II-86	Nº 3	0 (FG)	L	A		- 2.5		"	7	PS54	VER A	Fra	+19/VI
12	"	11	-1 (FG)	R	B		- 2.5		"	6	PS54	" A	Jim	+19/VI
13	"	8	0 (FG)	L	A'		- 2.5		"	7	PS54	" A	CaJ	+19/VI
14	"	4	0 (FG)	R	A'		- 2.5		"	7	PS54	" A	CaJ	10/III
15	"	23	0 (FG)	R	?		- 2.5		"	7	PS54	" B	Cac	7/III

4/24-1/21/86  
 Sta. Amnra

移植結果(II)

RESUMEN DE TRANSPLANTE

	F.C.V	POZO AZUL	STA. CARMEN
新鮮卵			
FRESCO	移植頭數 5	0	5
PREÑEZ OBTENIDA	妊娠頭數 3 *	-	3
凍結融解卵			
CONGEL.	移植頭數 5	0	0
PREÑEZ OBTENIDA	妊娠頭數 1	-	-

-Para-recipientes de estancia Quyuqhó -

LAVADO SIMPLE 自然排卵利用による1個排卵の成績

DONANTE 供卵牛	Nº	TOTAL DE C.L. 黄体数	EMBRION COLECTADO 回収された卵	DESARROLLO スライジ	GRADO 評価
8206	1	0	0	-	-
22	1	1	1	ER	A
19	1	0	0	-	-
8206	1	0	0	-	-
TOTAL 合計	4	1	1		

INFORME

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS EN EL PARAGUAY

Laboratorio de Transferencia de Embriones,  
Departamento de Reproducción Animal,  
La Facultad de Ciencias Veterinarias,  
Universidad Nacional de Asunción

Prof. Dr. Roberto Cajés Moran

Dr. Cayetano Jiménez Mendoza

Dr. Luis Alberto Franco Saenz

Dr. Ignacio Cáceres Caballero

Dr. Cesar Prieto

Dra. Raquel Romero

Experto de la Misión Técnica Japonesa

Dr. Toshiyuki Kojima

(28 de sept. 1985 - 24 de oct. 1986)

\*\* octubre de 1986 \*\*

## CONTENIDO

Introducción .....	358
Selección de donantes .....	359
Sanidad de donantes .....	360
Alimentación de donantes .....	361
Detección de estro en donantes .....	361
Selección de recipientes .....	361
Sanidad de recipientes .....	362
Detección del estro en donantes y recipientes .....	363
Identificación de recipientes .....	364
Alimentación de recipientes .....	365
Coservar el tamaño del hato .....	365
Sincronización del estro en donantes y recipientes .....	366
Superovulación .....	367
Inseminación .....	370
Recolección de embriones .....	371
Aislamiento de embriones .....	374
Manipulación de embriones .....	375
Evaluación de embriones .....	376
Sistemas de cultivo .....	377
Transferencia embrionaria .....	379
Transporte de embriones .....	381
Manejo de las recipientes preñadas .....	381
Procedimientos para la congelación y descongelación de embriones .....	382
Control de datos .....	385
Coefficientes de éxito .....	385
Etapas en el proceso de TE y posibilidades para su control en el Paraguay .....	387
Miscelaneos .....	389
Referencias .....	391
Programa de superovulación y sincronización .....	392
Protocolo para preparar soluciones .....	
Solución de yodo .....	
Protocolo para preparar suero .....	
Método de FDA .....	
Protocolo para congelar y descongelar embriones .....	
Programa del curso sobre TE .....	
Formulario de encuesta para distribuir al dueño de la Estancia .....	
Formularios para llevar datos .....	
Protocolo para superovulación de coneja .....	
Protocolo para recolectar embriones de coneja .....	
Certificación sanitaria para TE en ganado .....	
Resultados de nuestro trabajo .....	
TE en al Paraguay .....	



## INTRODUCCION

El Proyecto de mejoramiento de la Reproducción Animal abarca los siguientes tres campos; Reproducción animal, Sanidad animal, Nutrición animal, esto con la finalidad de incrementar la eficiencia reproductiva del ganado de carne en el Paraguay. En el área de la reproducción animal, las técnicas de inseminación artificial y transferencia de embriones pueden ser utilizados para incrementar la eficiencia reproductiva. El objetivo de la búsqueda e investigación de las otras dos áreas es para consolidar del medio dentro del cual el performance de la reproducción puede ser dado plenamente.

Los objetivos de la implementación de la técnica de transferencia embrionaria en este proyecto son:

1. Buscar el método más apropiado de la transferencia de embriones (TE) en el ganado de carne sobre todo en las razas cebuinas que es el tipo de ganado que más abunda, y que se adapta a las condiciones de la ganadería paraguaya.

2. Demostrar que ésta técnica se puede aplicar en el Paraguay.

Mi función era acelerar la técnica de TE y buscar la más adecuada para Paraguay. Además enseñar a mis contrapartes.

Este es un informe sobre el procedimiento de la técnica y el trabajo durante mi misión en 1985-1986.

## SELECCION DE DONANTES

Con el fin de demostrar que la técnica de TE puede ser utilizada como una forma de manipulación genética, debemos seleccionar los criadores de razas puras quienes están deseosos de mejorar y multiplicar sus rebaños. En general el sistema de alimentación del ganado de carne en el Paraguay es muy extensivo. Cuando la técnica de TE es introducida en un sistema extensivo debemos investigar si dicha técnica debe o no ser modificada para conseguir el éxito. Es esencial cooperar con las Estancias, y la técnica y conocimientos de alto nivel son requeridos para contentar nuestras demandas.

Generalmente el 10-20 % de los mejores animales en un hato élite de ganado puro, puede económicamente ser usado como donantes durante una época regular de apartamiento en la Estancia. La selección debería ser basada en tres criterios: superioridad genética, habilidad reproductiva y valor del mercado de la prole. Cuando se seleccionan las vacas de carne como donantes estos deben ser y algunas genéticamente superiores, características tales como la habilidad materna, época de destete, y edad al primer servicio, deben ser consideradas.

Las novillas pueden ser valiosas como donantes de embriones, pero generalmente el porcentaje de éxito es considerablemente bajo. Las hembras con problemas de infertilidad, también pueden donar embriones, pero la propagación de hembras infértiles no es recomendable. Las buenas candidatas para la propagación son aquellas vacas probadas como buenos vientres que ciclan normalmente, pero que muchas veces son incapaces de mantener su preñez por enfermedad, accidente o vejez. A medida que la edad avanza (después de 10 años), el índice de fertilización declina.

La selección del semental utilizado en el servicio es muy importante, pues los toros pueden ser evaluados genéticamente con más precisión que las hembras.

#### SANIDAD DE DONANTES

Donantes potenciales deberán estar con buena salud. Aquellas vacas en pobres condiciones de salud no responderán al tratamiento de superovulación porque el sistema reproductivo es muy sensitivo a los problemas generales del cuerpo.

Para investigar las enfermedades como trichomoniasis, campilobacteriosis y brucelosis, los exámenes de sangre y secreciones son realizados en este proyecto.

Los órganos reproductivos son examinados por palpación rectal para detectar anormalidades y posibilidades de preñez. El diámetro cervical es más grande, en las razas Santa Gertrudis, Nelore y Brahman que en el Bos Taurus y las cruas. Las razas Santa Gertrudis, Nelore y Brahman tienen la cervix en forma de cono. La forma conica de la cervix está asociada con una baja fertilidad en las vacas de 1-4 años de edad pero no en vacas de 4 años de edad. Al implementar la TE en el Paraguay debemos tomar en consideración las características de la cervix en las razas cebuínas.

Una vez que todos los exámenes son negativos (si es posible, dos series con 30 días de intervalo), el animal entra al grupo de donantes. Cateterismo se necesita para saber la dificultad de pasada a través de la cervix. Después solución de yodo (30-50 ml, 2 mg yodo/ml) se inyecta dentro del útero para limpiarlo y remover endometris.

La donante deberá ser vacunada al menos contra aftosa, brucelosis, tuberculosis, etc.

#### ALIMENTACION DE DONANTES

Generalmente tanto la obesidad como la condición de enflaquecimiento pueden reducir la fertilidad.

El sistema de alimentación del ganado de carne en el Paraguay es muy extensivo. Debemos estudiar si las vacas donantes pueden o no pueden desplegar su máximo potencial genético bajo esa condición extensiva.

#### DETECCION DE ESTRO EN DONANTES

La detección del estro es fundamental para conseguir el éxito en la TE. El ciclo estral de la donante deberá ser controlado con la mayor precisión posible, ya que el tratamiento de la superovulación se hace en base al tiempo del estro. Es importante que los ciclos estrales sean normales en tiempo y duración.

#### SELECCION DE RECIPIENTES

La recipientes ideal es una vaca joven, libre de enfermedades, fértil y con buena habilidad materna. Suponiendo que el ternero a desarrollar es relativamente grande, la recipiente deberá también ser de buen tamaño y tener una historia de partos normales. La raza parece no tener una consideración significativa, aunque los

animales cruzados generalmente son más fértiles. La mayoría de los animales en oferta son muy jóvenes (novillas), o vacas que han sido descartadas por infertilidad. Un pequeño porcentaje de novillas tiende a ser infértiles y con dificultades al parto. No obstante, si las vacas han sido rechazadas por infertilidad, entonces las novillas son el mejor recurso. Las vacas viejas (mayores de 10 años) no deberán utilizarse por su decreciente habilidad en mantener la preñez, pero al lado de esto, la edad no es un factor importante en la búsqueda de recipientes con más de un parto. La compra de novillas preñadas es una buena fuente de futuras recipientes. En algunas situaciones no es práctico desde el punto de vista económico, organizar un hato de recipientes ideales.

Animales salvajes son indeseables por las condiciones de manejo, pero su disposición no quiere decir que afecte el éxito de la transferencia de embriones. Otra alternativa sería utilizando animales jóvenes de un hato envuelto en un programa de inseminación. Sin embargo, se debe tener mucho cuidado en no extender la época de servicios para reducir los gastos.

#### SANIDAD DE RECIPIENTES

Los animales deberán ser sometidos a los exámenes de rutina y evaluación reproductiva, para descartar anormalidades en el tracto reproductivo, posibles preñeces y enfermedades en período de incubación.

En este proyecto los exámenes de sangre y secreciones se utilizados para investigar enfermedades como trichomoniasis, campilobacteriosis y brucelosis. Una vez que todos los exámenes son negativos,

el animal entra al grupo de recipientes. Algunas veces solución de yodo se inyecta dentro de el útero de recipientes para limpiarlo y prevenir de las infecciones de el útero.

#### DETECCION DEL ESTRO EN DONANTES Y RECIPIENTES

El éxito en un programa de TE requiere de la detección precisa del estro en los animales.

La detección del estro para donantes y recipientes debe ser cuidadosa, precisa y concienzuda, pues el éxito de TE depende de su sincronía. El mayor éxito se consigue si la recipiente está en celo  $\pm$  un día de la donante. La sincronización de  $\pm$  medio día es aún mejor. Conociendo que muchas de las manifestaciones del estro ocurren durante la noche y éstas no se observan en la mañana ni en la tarde siguiente, la recipiente que se observa en estro medio día fuera de sincronización con la donante puede ser considerada como cero(0) día con la donante.

Cada vaca o novilla es chequeada visualmente para detectar su celo dos veces al día; temprano en la mañana y en las horas de la tarde. Las donantes son chequeadas adicionalmente durante el día y a menudo puestas con un grupo de vacas vacías para establecer el periodo de mayor receptibilidad. El método más eficiente para detectar el estro en los animales es revisándolos individualmente durante 10-15 minutos o más, dos o tres veces al día.

Algunos signos se consideran como sospechosos de estro tales como señales de fricción y pelo de las ancas levantado, inquietud, bramidos, caminando a lo largo de la cerca, codeando, montando a otras vacas, olfateando, levantando la cola, secreción de moco claro a través de la vulva y ésta de color rosado y ligeramente inflamada. La hemorragia que se presenta durante el metaestro-sangre alrededor de

la vulva, la cola y los cuartos traseros del animal generalmente ocurre dos o tres días después del estro. Esta hemorragia es un buen indicio de que la vaca está ciclando normalmente y siempre debe anotarse en los registros de las donantes y recipientes si el estro no se detectó durante el ciclo.

Un buen auxiliar en la detección precisa del estro en las donantes es la utilización de un calendario. Cuando el estro es detectado, se debe anotar el número del animal y predecir el próximo estro con 18 días de anterioridad. Así las donantes que estarán en estro entre 18-24 días pueden ser observadas cuidadosamente con anticipación. Tan pronto se detectan los signos iniciales del estro, deben anotarse individualmente en un libro donde las anotaciones diarias se registran y luego se anotan en tarjetas individuales.

Toda ayuda en la detección del estro son útiles siempre y cuando no interfieran con la detección visual. La utilización de toros celadores vasectomizados, con penes desviados o bloqueados, no es muy recomendable por el hecho de no garantizar esterilidad total. Fuera de ello, estos toros pueden transmitir enfermedades venéreas. Si se desea utilizar un animal para detectar el estro, es mejor emplear hembras androgenizadas.

#### IDENTIFICACION DE RECIPIENTES

La identificación individual de los animales en un programa de TE es absolutamente indispensable si se quiere tener seguridad del éxito envuelto en el citado proceso. Así es que un sistema de identificación temporal y permanente es necesario. Todas estas marcas,

tatuajes o sistemas de numeración se deben registrar en las tarjetas individuales.

Si se quiere registrar secuencialmente las transferencias, es aconsejable poner una marca o tatuaje adicional en la oreja de la recipiente en el momento de la transferencia.

#### ALIMENTACION DE RECIPIENTES

Generalmente tanto la obesidad como la condición de enflaquecimiento pueden reducir la fertilidad. Las recipientes deberán ser alimentadas adecuadamente para mantener preñez y para que su lactancia sea normal. Con buen manejo, la pérdidas de terneros al destete no deben pasar del 5-6 %.

El sistema de alimentación del ganado de carne en el Paraguay es muy extensivo. Debemos estudiar si las recipientes pueden o no pueden desplegar su máxima habilidad maternal bajo esa condición extensiva.

#### CONSERVAR EL TAMAÑO DEL HATO

El tamaño del hato de recipientes depende en su mayoría del número de donantes programados. También el tamaño depende del método de detección de estro, el número de persona quien detecta estro y la frecuencia de recolección de embriones.

En general una donante que cicla normalmente antes del tratamiento y es superovulada por primera vez, produce un promedio de 7 embriones transferibles. Por consiguiente, se deben preparar 7 recipientes por una donante. Si 20 recipientes son palpados para cuerpo luteo



(CL), el obstetra puede definitivamente identificar un promedio de 12 con CL en sus ovarios. Si éstas 12 son inyectadas con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), 9-10 de estas en promedio serán sincronizadas oportunamente con la donante.

#### SINCRONIZACION DEL ESTRO EN DONANTES Y RECIPIENTES

Se puede preparar las recipientes para las donantes, mediante la sincronización del estro con  $PGF_{2\alpha}$  o un análogo de la  $PGF_{2\alpha}$ . Si las recipientes han sido palpados para detectar un CL al momento de la transferencia, la incidencia de preñez será igual a aquellas recipientes que lo desarrollaron exhibiendo un calor natural.

Los siguientes dos métodos son usados en la sincronización de recipientes:

1. Palpar recipientes para CL a inyectar  $PGF_{2\alpha}$  o análogo a aquellas con CL. El estro se presenta 48-96 horas más tarde y la mayoría están en estro alrededor de las 60 horas.
2. Inyectar todas las recipientes con  $PGF_{2\alpha}$ , sin tener en cuenta la presencia o ausencia de CL. Repetir la dosis de  $PGF_{2\alpha}$  11 días más tarde. Signos de estro se presentarán entre 2-3 días. Aquellas recipientes que responden están en la mitad del ciclo al momento de la segunda inyección de  $PGF_{2\alpha}$ . Aquellas recipientes que no responden en la primera ocasión se debe a que estuvieron en los cinco primeros días del ciclo estral y responderán a la segunda dosis, pues en ese momento se encontrarán entre la mitad y la fase final del ciclo.

Las recipientes se deben inyectar con  $PGF_{2\alpha}$  un día antes que la donante. Como resultado a este tratamiento previo, la mayoría de las donantes entrarán en calor 36-60 horas (promedio 42 horas) después de las prostaglandinas, mientras que las recipientes entrarán

en calor entre 48-96 horas (promedio 60 horas) después de la inyección de  $\text{PGF}_2\alpha$ .

Cerca de un 85% de donantes responderán a las gonadotropinas en el primer intento, pero frecuentemente no se recobran embriones cuando solamente una donante se superovula; tales fallas son costosas.

#### SUPEROVULACION

El nacimiento de las terneras cuentan con 1,000 veces más ovocitos de los que madurarán y ovularán. A través de la vida reproductiva del animal, los folículos con sus ovocitos son constantemente degenerados. La superovulación toma ventaja de éste potencial representado por los folículos, que de otra forma nunca ovularán. El mecanismo de las hormonas superovulatorias es desconocido, pero algunos folículos pueden ser rescatados de su degeneración.

Antes de iniciar el tratamiento de la donante, su ciclo estral deberá ser controlado al menos una vez y más de una vez, en caso de que sea irregular en su duración.

La hormona folículo estimulante (FSH) se utiliza más comunmente en la superovulación. Se ha observado gran variación de respuesta en vacas que han recibido la misma dosis. FSH estimula la maduración de folículos. FSH se utiliza 8 dosis (9-2 mg por inyección) por vaca donante con un intervalo de medio día, comenzando cualquiera de los días (9-14) del ciclo estral. Así, se mantienen los niveles sanguíneos suficientes para estimular el desarrollo folicular. La  $\text{PGF}_2\alpha$  se administra en combinación con la FSH para asegurar un

intervalo predecible entre la terminación del efecto de la gonadotropina y el estro. Cuando se usa la PGF para superovular las vacas, el estro se presenta en dos días mientras que en vacas no tratadas, el estro ocurre en tres días. Esta diferencia quizás se debe al alto nivel de estrógenos en las vacas superovuladas. Las prostaglandinas ofrecen la gran ventaja de flexibilidad en programar el estro y escalonar las donantes o evitar días de fiesta; adicionalmente mejora la eficacia de la superovulación.

Dos mg de FSH por mililitro es un volumen práctico para preparar. Una vez diluido el producto en solución salina, puede ser almacenado en refrigeración. La FSH puede ser inactivada por microorganismos cuando se emplean agujas hipodérmicas previamente utilizadas. Nosotros preparamos, almacenamos, diluimos y refrigeramos la FSH directamente en jeringas hipodérmicas, listas para ser usadas. Se ha observado diferencia de respuesta en vacas que han recibido el lote diferente de FSH. Para examinar la eficiencia de FSH se puede consultar el resultado de superovulación en coneja.

La adición de hormona luteinizante (LH) no es necesaria. Es factible que algunos lotes de producción de FSH contienen exceso de LH interfiriendo con óptimos resultados. Una dosis exógena de LH no es necesaria para inducir ovulación en vacas que se están superovulando. Pues, la LH endógena se libera normalmente. En algunos casos, los folículos pueden ovular en períodos superiores a las 24 horas. Cuando esto ocurre, muchos óvulos pueden quedar sin fertilizar.

Nosotros controlamos el tamaño del ovario por palpación rectal, comenzando en el primer día de tratamiento y también chequeando los CL. Si un CL no es palpado y los ovarios son similares en tamaño, o si un folículo grande (>2.5 cm) está presente pero no existe un CL, el tratamiento de superovulación es pospuesto hasta el siguiente ciclo estral. En el quinto día, después de iniciar el tratamiento con FSH, el

tamaño de los ovarios es estudiado nuevamente para determinar la respuesta folicular. El tamaño de ovario es un excelente indicador de la respuesta.

La palpación de los ovarios al momento del estro y ovulación no es recomendable. Sin embargo, palpar los ovarios de animales superovulados, uno o dos días antes de la colección, a menudo, es útil para determinar la respuesta y decidir si la colección se efectúa o no. Ocasionalmente, una donante mostrará signos de calor, después de uno o dos días de ser tratada con FSH. Si se sirven estos animales raramente producen óvulos fértiles, o sea, que el semen muy costoso no debe ser utilizado en este momento. Similarmente, si una donante entra en calor más de dos días después de la fecha del estro predicho, los embriones raramente son colectados.

Generalmente la superovulación puede ser repetida aproximadamente cada dos meses. Para eso, es recomendable que  $\text{PGF}_2\alpha$  se inyecte a donante inmediatamente después de la recolección.

Respuestas inmunológicas a la repetición de tratamientos con gonadotropinas pueden limitar el número de veces que una donante puede ser superovulada. Esta respuesta antigénica también implica que los tratamientos repetidos pueden estimular la producción de antigonadotropinas, las que pueden reducir subsecuentes repuestas o quizás aún interferir con gonadotropinas endógenas.

Las grandes diferencias individuales de las donantes para responder a las gonadotropinas, en mascararían las pequeñas diferencias entre razas, si ellas existen.

Numerosos reportes indican que la fertilidad del ganado declina por fatiga o tensión debida a los largos períodos de calor, y es

muy razonable asumir que la superovulación durante el tiempo caluroso produce menos embriones que con donantes en condiciones normales. Nosotros debemos pensar la influencia calurosa contra superovulación en el Paraguay donde queda en una zona subtropical.

#### INSEMINACION

Después de supervisar el tratamiento de superovulación en una donante, ésta deberá ser observada minuciosamente en la manifestación de signos de estro. Las vacas superovuladas muchas veces no muestran signos de estro tan claros como las no tratadas, cualquier ayuda en la detección del estro es muy eficaz. Cerca de un 10% de donantes nunca muestran signos de estro. Estos animales no deberán ser servidos.

El primer momento cuando la donante manifiesta el estro verdadero, es el punto de referencia para el servicio de inseminación. El hecho que los folículos ovulan en un período de tiempo y que el transporte del espermatozoide y óvulo alterado por la superovulación, es aconsejable servir con más frecuencia y utilizar mayor cantidad de semen. Semen fresco es superior al semen congelado quizás porque los espermatozoides del semen fresco permanecen viables por mayor tiempo en el tracto reproductivo de la hembra.

Si el semen congelado es utilizado, la ampollita o pajuela es inseminada 12 horas después de que la donante fue detectada en estro y una segunda dosis 12 horas después de la primera inseminación. El semen se descongela en agua 35°C (30 sec) y se insemina inmediatamente.

El semen debe ser de alta calidad. La utilización de semen mediocre o de calidad pobre a menudo resulta en una colección de

óvulos sin fertilizar o embriones degenerados. La persona que insemina las vacas donantes deberá ser muy cuidadosa y muy profesional, pues la tensión nerviosa a que la vaca es sometida durante la superovulación hace que el tracto reproductivo se vuelva muy delicado. La manipulación excesiva del tracto, hace que la fimbria falle en la acción de recoger los óvulos. La introducción de una infección al momento de la inseminación podría reducir los índices de fertilización y recuperación de embriones. Además, al momento de la primera inseminación, muchos folículos no han ovulado; por consiguiente el tracto no debe ser manipulado en exceso para evitar posibles rupturas de folículos. Después de sacar el inyector para la inseminación artificial, es recomendable que se masaje el útero y el clítoris por 5 segundos. Esto afecta la movilidad de el útero y de el oviducto y promueve el transporte espermático. Esta estimulación de el clítoris en el momento de la inseminación artificial fue un efectivo medio para incrementar la tasa de preñez en vacas adultas, pene no en vaquillas.

#### RECOLECCION DE EMBRIONES

En el momento, la recolección transcervical, noquirúrgica es la técnica utilizada.

Para fines comerciales, se ha intentado recobrar embriones 6-9 días después del estro. Las donantes generalmente son privadas de tomar agua e alimento durante 24 horas. Las vacas de carne son colocados en "bretes con prensa", las vacas donantes manejadas con cabestro son colocadas en corrales individuales. La base de la cola es rasurada, lavada con jabón antiséptico y enjuagada con un alcohol al

70%; se administra una inyección epidural de 5 ml de procaina al 2%. La cola se sujeta. Si el recto se llena con aire, este aire puede ser removido con un tubo plástico de 0.5 cm de D conectado en su extremo a una aspiradora. El área alrededor de la vulva es lavada y esterilizada y el número de CL, folículos y tamaño de los ovarios. Disen que la precisión de la técnica es pobre, si mas de 6 CL se encuentran en el ovario.

El paso siguiente es apartar los labios vulvares, y si es necesario, introducir un dilatador a través de la vagina y colocarlo en el lumen de la cervix. Ejerciendo poca presión, el dilatador se pasa a través de la cervix con sumo cuidado, para facilitar más tarde el paso del catéter de Foley. El uso del dilatador no es necesario para las vacas pero algunas veces es necesario para las novillas. Un catéter Foley de calibre francés 16, 18 o 20 (dependiendo del tamaño de el útero, diámetro de catéter Foley (mm) = calibre francés /3) con una varilla de acero inoxidable en su interior se introduce por la vagina y se pasa a través del lumen de la cervix dilatado. El catéter luego es manipulado en el cuerno uterino seleccionado y así el balón inflable es situado por detrás de la bifurcación de los cuernos. El balón (globo) es inflado, rápidamente con 10-15 ml de aire dependiendo del catéter utilizado; la adición de 2-6 ml. de aire son requeridos. El balón deberá estar ajustado a la pared del cuerno uterino para evitar cualquier escape del medio que se va a inyectar. Generalmente, 10-15 ml de aire son necesarios para las novillas y 18-22 ml para las vacas.

Otra alternativa que se puede usar es la llamada "lavado del cuerpo", en ésta el balón del catéter Foley se infla en el cuerpo de el útero con solución salina estéril en lugar de aire. El catéter después se hala hacia atrás en dirección a la cervix, y el útero se llena con el fluido.

Aproximadamente 1 litro y medio (modificación del Dulbecco fosfato salino con albumina bovina, 4 mg/ml), se calienta a 37°C y se empaca en una botella vidrio, de las utilizadas para la transfusión sanguínea y se le adapta un tubo de drenaje. Este tubo se conecta con el tubo de entrada del catéter Foley y el conector en Y.

Un pedazo de tubo de goma (Tygon tubo) de 0.5 m de largo se conecta al tubo de salida del catéter de Foley a través del adaptador en Y, y el otro extremo se suspende a un cilindro de 500 ml. El tubo de drenaje se regula con un clamp. La unión útero-tubárica se oprime por presión de los dedos índice y pulgar y el cuerno uterino se llena con el medio. Con el resto de los dedos el técnico agita el útero para desalojar los óvulos incrustados en los pliegues del endometrio. Después, el tubo de drenaje se abre y el clamp se pone en el tubo de entrada. El medio con los óvulos saldrá al exterior. Una vez que el líquido ha salido, la unión útero-tubárica se deja libre y el resto del medio se extrae.

Este proceso se repite hasta que 500 ml han sido usados. Como todo el proceso es interno potencialmente los agentes infecciosos no pueden entrar.

Cuando se usa una jeringa para inyectar el medio en el útero, existe la tendencia de llenar el útero muy rápido, lo cual puede producir daños en el endometrio debido a la inesperada presión dentro de el útero. Una desventaja de este sistema es el continuo abrir y cerrar.

El sistema de filtro (la malla del filtro: 75 µm que recién desarrollado en Estados Unidos acelera el proceso de aislamiento de los embriones y reemplaza el sistema convencional. Este sistema usando