

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL LABORATORIO DE
PATOLOGÍA ANIMAL A NIVEL UNIVERSITARIO”**

POR:

ARIADNA CHÁVEZ OBISPO

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“TÉCNICAS UTILIZADAS EN LABORATORIO DE
PATOLOGÍA ANIMAL A NIVEL UNIVERSITARIO”**

POR:

ARIADNA CHÁVEZ OBISPO

MONOGRAFÍA.

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“TÉCNICAS UTILIZADAS EN LABORATORIO DE
PATOLOGÍA ANIMAL A NIVEL UNIVERSITARIO”**

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ARIADNA CHÁVEZ OBISPO

ASESOR

MVZ. JESÚS A. AMAYA GONZÁLEZ

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

MONOGRAFÍA

**“TÉCNICAS UTILIZADAS EN LABORATORIO DE
PATOLOGÍA ANIMAL A NIVEL UNIVERSITARIO”**

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

PRESIDENTE DEL JURADO

MVZ. JESÚS A. AMAYA GONZÁLEZ

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA
ANIMAL**

MC. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELIAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**“TÉCNICAS UTILIZADAS EN LABORATORIO DE
PATOOGÍA ANIMAL A NIVEL UNIVERSITARIO”**

**TESIS ELABORADA BAJO SUPERVISIÓN DEL COMITÉ DE
ASESORIA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**MVZ. JESÚS A. AMAYA GONZÁLEZ
PRESIDENTE**

**MC. JOSÉ LUIS COVARRUBIAS CASTRO
VOCAL**

**MC. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS
VOCAL**

**MS. DELFINO REYES MACÍAS
VOCAL SUPLENTE**

DEDICATORIAS

A MIS PADRES.

Profra. Ma. Antonia Obispo Ramírez

y

Profr. Francisco Chávez Chávez

Quienes han sido unos grandiosos padres, porque gracias a su apoyo, cariño y comprensión he logrado la profesión que ahora tengo, a base de sus esfuerzos y sacrificios logre terminar la carrera que tanto he anhelado. Gracias por confiar en mi y apoyarme en todas mis decisiones, logrando hacer de mi una persona de bien; por esto y mas....Dios los bendiga.

A MIS HERMANOS

Argelia

Gamaliel

Maciel

Con todo mi cariño, para quienes han sido un gran ejemplo a seguir, por sus consejos, su apoyo incondicional, su amistad y por todos los momentos que hemos pasado juntos.

Mil gracias por todo. "Los Quiero".

A mi cuñada Sayi, que siempre luche por lo que quiere y anhela, por la unidad de la familia, tan fundamental para la superación de la misma.

A MI NOVIO

Edgar Ángeles Chino

Por ser quien es y como es, por su apoyo, su comprensión y su gran amor. Por estar conmigo en todo momento, en mis alegrías y mis tristezas, en mis triunfos y fracasos, por ser mi gran y mejor amigo. "TE AMO CON TODA EL ALMA".

A MIS TIOS

Sra. Cari, Sr. Abel, Sra. Ricarda, Sra. Virginia, Sr. Jesús, Profr. Andrés y Profr. David, por su apoyo, consejos y cariño durante todo este tiempo.

A MIS PRIMAS Y PRIMOS

Erika, Maribel, Noemí, Loreli, Leidy, Marcos y Antonio, por sus consejos, su apoyo y cariño, ya que ellos al igual que mis hermanos han sido un gran ejemplo para mí. Que todo lo que se propone uno en la vida se puede lograr. Gracias por todo.

A MIS AMIGOS

Paola, Judith Cristina, Hassan y Magdiel, quienes han sido verdaderos amigos en todo momento, que cuando los he necesitado han estado conmigo, por todos los maravillosos ratos que hemos pasado juntos, por su apoyo y cariño.

AGRADESIMIENTOS

A DIOS

Por permitirme seguir viviendo, por todas las bendiciones que he recibido, por darme la oportunidad de ser alguien en la vida y sobre todo por darme una gran familia.

Al MVZ. Jesús A. Amaya González por la orientación y el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Al MC. José Luis Covarrubias Castro, mis agradecimientos por la orientación y sugerencias para la realización de este trabajo.

Al MC. José Luis Fco. Sandoval Elías por su participación en la elaboración final de este trabajo.

Al MS Delfino Reyes Macias por su valiosa aportación para la realización del presente trabajo y su amistad.

A todos aquellos maestro, que gracias a ellos y a su enseñanza me brindaron los conocimientos adecuados para llegar a ser una profesionista.

A mi “**Alma Terra Mater**” por abrirme las puertas, brindarme las facilidades de alcanzar una meta en la vida y por haberme cobijado durante cinco años en su regazo.

“GRACIAS”

ÍNDICE DE CONTENIDO

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- HEMATOLOGÍA.....	3
2.1.- Introducción.....	3
2.2.- Consideraciones generales de seguridad.....	3
2.2.1.- Manejo y desecho de agujas y guantes.....	4
2.3.- Preparación del paciente.....	4
2.3.1.- Preparación del sitio de punción.....	5
2.3.2.- Punción y sitio de punción.....	6
2.3.3.- Bovino.....	6
2.3.4.- Ovejas.....	7
2.3.5.- Caballo.....	8
2.3.6.- Cerdos.....	8
2.3.7.- Perros y gatos.....	9
2.3.8.- Aves.....	9
2.4.- Manejo de muestras.....	10
2.4.1.- Plasma.....	11
2.4.2.- Suero.....	11
2.5.- Conservación de la muestra.....	12
2.6.- Transporte de la muestra.....	13
2.7.- Tiempo de coagulación.....	13
2.8.- Retracción del coágulo.....	15
2.9.- Hematocrito según Wintrobe (macrohematocrito).....	17
2.10.- Hematocrito (microhematocrito).....	19
2.11.- Recuento de Eritrocitos.....	20
2.12.- Recuento de Leucocitos.....	25
2.13.- Recuento diferencial de Leucocitos.....	28

2.13.1.- Frotis de sangre.....	28
2.13.1.1.- Preparación del frotis sanguíneo.....	29
2.13.1.2.- Tinción del frotis.....	30
2.13.2.- Tinción de Wright.....	30
2.13.3.- Técnica de Giemsa.....	31
2.13.4.- Examen del frotis sanguíneo.....	31
2.14.- Recuento de Plaquetas.....	32
2.15.- Frotis sanguíneo.....	35
2.15.1.- Preparación del frotis sanguíneo (Met. Extensión).....	35
2.16.- Serodiagnóstico en Brucelosis.....	37
2.16.1.- Prueba rosa de bengala (Tarjeta o Card-Test).....	38
2.16.2.- Anfígeno para el diagnóstico de brucelosis (prueba en placa rápida).....	40
2.16.3.- Aglutinación en placa por precipitación por rivanol.....	46
2.16.4.- Prueba de Fijación del Complemento.....	48
2.16.5.- Prueba del Anillo en Leche o de Bang.....	50
III.- ANALISIS DE ORINA.....	58
3.1.- Obtención de la muestra.....	59
3.2.- Examen físico.....	60
3.2.1.- Examen macroscópico.....	60
3.3.- Examen químico.....	62
3.4.- Examen microscópico.....	64
3.5.- Reporte de un EGO.....	65
IV.- PARASITOLOGÍA.....	66
4.1.- Introducción.....	66
4.2.- Examen de heces.....	66
4.2.1.- Consejos para lo obtención, manejo, almacenamiento y transporte de las muestras.....	66
4.2.2.- Examen macroscópico.....	68

4.2.3.- Examen microscópico.....	68
4.2.3.1.- Métodos cuantitativos.....	68
4.2.3.2.- Métodos cualitativos.....	68
4.3.- Examen Coproparasitoscopico en Fresco (CPS).....	69
4.4.- Examen CPS Concentración por Sedimentación.....	71
4.5.- Examen CPS Técnica Concentración por Sedimentación para muestras frescas.....	73
4.6.- Examen CPS Método de Concentración por Flotación de Willis.....	76
4.7.- Examen CPS Método de Concentración-Flotación Faust.....	78
4.8.- Examen CPS Método de Kato.....	81
4.9.- Kato Cuantitativo.....	83
4.10.- Tinciones temporales.....	84
V.- BACTERIOLOGÍA.....	86
5.1.- Introducción.....	86
5.2.- Obtención de la muestra.....	86
5.3.- Manejo.....	87
5.4.- Almacenamiento.....	88
5.5.- Transporte.....	88
5.6.- Inoculación e incubación de medios de cultivo.....	88
5.6.1.- Puntos generales para una técnica adecuada.....	88
5.6.2.- Inoculación de placas.....	89
5.6.3.- Inoculación sesgada.....	89
5.6.4.- Inoculación en caldo.....	90
5.6.5.- Incubación en tubos.....	90
5.7.- Evaluación de los resultados de un cultivo.....	90
5.7.1.- Cambios del medio ambiente.....	90
5.7.2.- Evaluación microscópica.....	91
5.7.3.- Pruebas de diferenciación.....	91
5.8.- Tinción y métodos semejante.....	91
5.8.1.- Introducción.....	91

5.8.2.- Preparaciones Húmedas.....	91
5.8.2.1.- Método de la gota pendiente para investigar la motilidad.....	91
5.8.2.2.- Tinción negativa.....	93
5.8.3.- Preparaciones fijas y teñidas.....	93
5.8.3.1.- Introducción.....	93
5.8.3.2.- Tinción de azul de metileno (Loefer).....	94
5.8.3.3.- Tinción de Gram.....	95
5.8.3.4.- Tinción de Ziehl-Neelsen.....	96
5.8.3.5.- Tinción de Kinyoun.....	97
5.8.4.- Identificación de las cepas aisladas (Enterobacterias).....	98
5.8.4.1.- Medio MIO.....	100
5.8.4.2.- Agar TSI.....	101
5.8.4.3.- Agar LIA.....	102
5.8.4.4.- Prueba de Oxidasa.....	103
5.8.4.5.- Indol.....	104
5.8.4.6.- Rojo de Metilo.....	104
5.8.4.7.- Voges-Proskauer.....	104
5.8.4.8.- Citrato.....	105
5.8.4.9.- Ácido Sulfhídrico (H ₂ S).....	105
Literatura Citada.....	106

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO 2.12.1.....	27
CUADRO 2.16.2.1.....	42
CUADRO 2.16.2.2.....	44
CUADRO 2.16.2.3.....	45
CUADRO 2.16.2.4.....	45
CUADRO 2.16.2.5.1.....	55
CUADRO 5.8.4.1.....	99
FIGURA 2.8.1.....	17
FIGURA 2.11.1.....	23
FIGURA 2.11.2.....	24

I.INTRODUCCIÓN

El proceso terapéutico en Medicina Veterinaria se fundamenta en un diagnóstico exacto. Cuanto mas precisas sean las técnicas diagnósticas empleadas, más exacto será el diagnóstico obtenido y más específica la terapéutica aplicada. En Medicina Veterinaria, siempre, el diagnóstico clínico tiene la mayor importancia.

Los análisis de laboratorio no se han extendido abiertamente en la práctica veterinaria como son necesarios, y quizás se debe, en gran parte, a que solamente existen técnicas apropiadas para escasas áreas prácticas. Con frecuencia falta espacio y desconocimiento técnico para su realización. Toda clínica veterinaria debe apoyarse con un laboratorio de calidad, con el equipamiento y personal necesario. Ahora nuestros conocimientos médicos, o la vigilancia de una terapéutica intensiva, no pueden llevarse a cabo sin los análisis de laboratorio pertinentes. En el pasado han sucedido casos de incidentes o daños por errores diagnósticos o falsas medidas terapéuticas, debido al poco avance de los análisis clínicos.

Las pruebas de campo o llamadas rápidas, por sus exigencias técnicas mínimas y el poco tiempo en su realización, son más adecuadas para el laboratorio práctico. Además no requieren muchos conocimientos técnicos especiales, se clasifican como métodos de laboratorio "sencillos".

En la práctica, es importante saber si la muestra por analizar está en condiciones fisiológicas, o presenta alguna alteración patológica, especialmente cuando se obtiene el resultado en poco tiempo o unas horas después de haber tomado la muestra. La ganancia del tiempo de la prueba sobresale, al igual que la precisión, mejorando las posibilidades diagnósticas.

En cualquiera de los métodos de laboratorio, la confiabilidad de los resultados depende, en todo caso, de las condiciones de toma de muestra. La coincidencia de la identidad del paciente con las muestras y los resultados deben estar absolutamente asegurados.

Una vez emitido el resultado, debe ser contrastado con el de la historia clínica (anamnesis) y la exploración física-clínica del animal para una interpretación correcta. La valoración y el juicio crítico de los resultados de laboratorio requieren al menos tanta experiencia como la interpretación de los hallazgos clínicos y resultados terapéuticos.

II. HEMATOLOGÍA

2.1.- Introducción

En los últimos años ha aumentado considerablemente el interés de la aplicación de los análisis clínicos veterinarios en el diagnóstico de patologías en animales. El área de "Hematología" tiene gran importancia en esta aplicación porque ofrece información adicional al veterinario para realizar un diagnóstico más preciso que conducirá al tratamiento específico, es decir, al tratamiento de la causa determinante de la enfermedad, en lugar de un tratamiento exclusivamente de los síntomas de ésta (6).

2.2.- Consideraciones generales de seguridad

Como las muestras de los pacientes son potencialmente infecciosas deberán ser observadas bajo las siguientes precauciones:

- a).- Cuando se toman muestras deben utilizarse guantes y a veces batas, cubreboca y anteojos de protección.

- b).- Los guantes deben cambiarse y lavarse las manos después del contacto con cada paciente. Desechar los guantes en un recipiente apropiado para residuos peligrosos.

- c).- Cualquier líquido derramado debe limpiarse con solución de hipoclorito de sodio al 10% (27,43).

2.2.1.- Manejo y desecho de agujas y guantes

a).- No reutilizar agujas.

b).- Desechar agujas y guantes sólo dentro de contenedores asignados.

c).- No retirar una aguja usada, manualmente, de la jeringa, sino retirarla utilizando un sistema de recolección de desperdicios, o tirar la unidad completa (si es desechable) en un contenedor diseñado especialmente.

d).- cuando se toman hemocultivos es peligroso e innecesario cambiar de agujas.

e).- No poner el equipo de venoclisis o cualquier otro equipo en la cama del paciente (1).

2.3.-Preparación del paciente

Material

- Jabón o solución yodada
- Solución alcohólica desinfectante.
- Torundas de algodón.
- Torniquete.
- Sistema de tubos al vacío con agujas y sujetados y/o jeringas con agujas.
(Tijeras o máquina de cortar pelo. En caso de ser necesario).

Método

La importancia del ayuno es conocida, debe ser no menor de 6 hrs. para hematología (12 hrs. recomendado para química sanguínea) (4).

Evitar un ejercicio extenuante en el paciente previo a la toma de muestras, ya que la actividad muscular intensa puede dar resultados falsamente anormales (1).

2.3.1.- Preparación del sitio de punción

La posición adecuada y sujeción efectiva del animal son esenciales para un muestreo con éxito. Un poco de tiempo empleado haciendo amigos, ganando la confianza del animal, son generalmente bien recompensados. La práctica apacible y suave deberá minimizar la necesidad de manejo físico humano. No solo deben ser minimizados los trastornos físicos y psíquicos sobre bases humanitarias, sino también porque la sangre tomada de un animal asustado, adrenalizado, puede originar resultados equivocados en varios análisis, por ejemplo, la glucosa y los ácidos grasos no esterificados (4).

El sitio de punción debe estar limpio y libre de patógenos, esto incluye recortar el pelo, lavarlo con jabón, detergente o solución yodada en dos veces y después realizar una limpieza con alcohol. El corte de pelo puede ser indeseable en animales de exhibición por lo que es necesario pedir el consentimiento del dueño, en caso que el corte no sea posible por algún motivo la limpieza debe ser más estricta. La asepsia debe realizarse en sentido contrario al crecimiento del pelo del animal y en forma circular del centro hacia la periferia. Después de la punción el sitio debe dejarse seco, limpio y libre de sangre ya que cualquier humedad o materia orgánica favorece las infecciones (3).

2.3.2.-Punción y sitios de punción

La sangre para análisis puede ser obtenida de venas, arterias o capilares. La punción arterial se utiliza principalmente para obtener muestra para análisis de gases en sangre (19). La sangre venosa es la muestra más común obtenida de los animales. Las técnicas varían de una especie a otra, según la localización de los vasos sanguíneos convenientes y el espesor, dureza y capa de la piel (3). Actualmente es más utilizado el sistema de tubos evacuados (es decir, al vacío), aunque también se puede utilizar aguja y jeringa (19).

Las muestras no deben tomarse de una canalización intravenosa, ya que puede contaminarse con la solución intravenosa. La aplicación del torniquete por un tiempo excesivo puede ocasionar hemoconcentración y aumento en la concentración de sustancias unidas a proteínas, como el calcio. La lisis de células durante la colección de una muestra de sangre dará un aumento falso de valores séricos de sustancias concentradas en las células (p. ej., lactato de deshidrogenado y potasio). (1)

Cuando sea factible, debe de colectarse sangre suficiente para realizar la prueba por triplicado, lo cual da margen para descartar errores humanos, del aparato o de diluciones en caso necesario (2).

2.3.3.- Bovinos

La sangre es obtenida de las venas yugular, mamaria (abdominal subcutánea) y caudales y de las arterias carótida, caudal y braquiales (5).

La vena yugular puede ser destacada presionando con los dedos el canal yugular o usando un cordón. El vaso prominente se ve bien en la mayoría de las vacas lecheras y se palpa fácilmente en los animales obesos. Tiene aproximadamente 2 cm de diámetro. Se introduce en la vena una aguja larga calibre 14 y de 5 cm de longitud, o calibre 16 y 10 cm de longitud (8).

La acertada penetración en el vaso se evidencia al brotar la sangre. Otra opción es introducir una aguja más fina (cal.18 de 38 mm.) en ángulo de 45° con la piel a lo largo de la vena. Este procedimiento es más fácil con la aguja insertada en una jeringa. Luego de haberse introducido la aguja se hace un poco de succión con la jeringa, si ésta entró en el vaso la sangre aparecerá en la jeringa. Puede ocurrir que la aguja atraviese la vena y que la punta quede fuera del vaso, entonces, retirando la aguja lentamente se llevará la punta dentro de la luz de éste. Extraída la sangre, se quita la presión sobre la vena y se aplica presión manual sobre la punción antes de sacar la aguja y por 30 a 60 segundos después para parar el sangrado (46).

La vena mamaria se punciona en forma semejante, cuidando el operador de no ser pateado. También es más difícil de limpiar la piel, pero es innecesario destacar la vena en la mayoría de los casos (3).

La vena caudal se encuentra muy cerca de la arteria, para realizar la punción se alza la cola y se clava una aguja pequeña calibre 20 ó 22 de 25mm y a 15 cm de la base de la cola verticalmente en la línea media hasta que penetre en el bazo. Se debe identificar la sangre como venosa o arterial; ésta es más roja y sale con mayor presión (2)

2.3.4.- Ovejas

La vena yugular es la más usada pero la vena y arterias femorales son también fáciles de puncionar. Se hace una partición en la lana, a veces previamente cortada, para exponer un área de piel limpia. La yugular se encuentra con frecuencia debajo de la piel pero puede estar incluida en el tejido adiposo. La piel es blanda y la aguja (calibre 18-22 de 25 mm) entra con facilidad y frecuentemente atraviesa el vaso. Haciendo un poco de succión, la sangre penetrará en la jeringa si la aguja se encuentra en la luz del vaso (9).

2.3.5.- Caballo

Para sangre venosa se utiliza la vena yugular. Con el pulgar izquierdo en el surco yugular a la mitad de su trayecto en el cuello, se comprime y sujeta la vena. Se clava la aguja (cal. 18-20 de 38 mm de longitud) en ángulo aproximado de 15° con la piel 1 cm arriba del pulgar que está sujetando el vaso, se introduce 1 ó 2 cm bajo la piel, se aumenta el ángulo a 45° y se empuja para que entre en la vena. Esta penetración debe hacerse en un solo movimiento suave y continuo. Esto ayuda a disminuir el sangrado al sacar la aguja. De la carótida puede obtenerse sangre arterial poco más o menos como en la vaca, pero el procedimiento requiere práctica y no debe ser intentado en un animal valioso por una persona inexperta. Es más fácil obtener sangre de la gran arteria metatarsiana, situada en una canaladura sobre la cara antero-externa del corvejón, entre el tercero y cuarto huesos metatarsianos. Se inyecta en la piel un poco de anestésico local, después de unos minutos, se pincha la arteria con una aguja de calibre 20 y 25 mm., mantenida en ángulo recto con el vaso, firmemente encajado en el surco óseo (13, 24).

2.3.6.- Cerdo

Se usan las venas de las orejas y la cola y la vena cava anterior. De una oreja se toma sangre por incisión de una vena con escalpelo o por punción con una aguja. La punción de la vena cava es peligrosa y deber ser practicada por una persona experta (35).

2.3.7.- Perro y gato

Es muy útil el servicio de un ayudante experto en el manejo de animales. Las venas cefálica y safena son usadas comúnmente en el perro y algunas veces en el gato. Con una mano el ayudante sujeta con suavidad la cabeza del animal y con la otra rodea por detrás, arriba del codo extendiéndolo un poco. Con el pulgar y los otros dedos de esta mano se fija la piel floja para sujetar el vaso firmemente. El operador inmoviliza el vaso con el pulgar e inserta la aguja (cal, 18, 22,25 o 38 mm.) arriba de este punto (5).

De la vena yugular se toma comúnmente sangre en el gato y algunas veces en el perro; el procedimiento es semejante al descrito para otras especies. La sangre arterial se obtiene de la vena femoral, que es palpada en su fosa. Este procedimiento es probablemente más largo y doloroso que la venipunción y se recomienda el uso de anestesia local (5).

NOTA: La cantidad de muestra obtenida a través de la punción debe tenerse en cuenta en las diferentes especies, es así como para las especies mayores puede obtenerse por punción sin causar trastornos hasta 15 ml de sangre, y en pequeñas especies la muestra no se puede exceder de 10 ml (6).

2.3.8.- Aves

Igualmente que para las otras especies la sujeción o inmovilización es de gran importancia para el éxito del procedimiento. Existen varios sitios de punción que serán elegidos de acuerdo a la experiencia del operador (1).

La vena radial (alar), es el sitio de punción mas comúnmente elegido por su facilidad; se elige una de las dos alas, se levanta, se sujeta el ala libre junto con las patas del animal, seguidamente quien realizara la punción inmoviliza con los dedos pulgar e índice la vena alar, previo a esto se debe desplumar el recorrido de la vena con el fin de visualizarla mejor, con aguja numero 21 se hace inserción sobre la vena en un ángulo de 15°, se debe tener cuidado de no extravasar ya que la pared de la vena es muy delgada y podría ocurrir con facilidad, un hematoma inmediatamente, si esto no sucede se procede a extraer la muestra, aproximadamente de 1 a 2 ml de sangre en aves de mayor tamaño, y en aves mas pequeñas 0,5 ml ya que una cantidad mayor puede producir anemias en esta especie. Otros sitios de punción menos utilizados son la vena atlantooccipital ubicada entre el atlas y la región occipital, la inserción de la aguja debe hacerse perpendicular al sitio antes mencionado. La punción intracardiaca debe realizarse con mucho cuidado ya que un error en ella, al puncionar las aurículas puede causar la muerte inmediata del animal (3).

NOTA: siempre debe quitarse la aguja de la jeringa y el tapón del tubo para dejar que la sangre corra al interior de éste. La introducción de la aguja por el tapón contribuye a la hemólisis en especial a las agujas de calibre < 25. (2)

2.4.- Manejo de muestras

Cada tubo debe de etiquetarse con claridad con el nombre del paciente, el nombre completo del propietario, fecha y hora de la obtención de la muestra.

Se debe de mezclar con suavidad el contenido del tubo si incluye algún componente interactivo, para evitar la hemólisis.

Los frotis de sangre deben de realizarse de inmediato, usando sangre recién extraída, y se dejan secar a temperatura ambiente (2).

Para la conservación del *suero* se debe esperar la retracción del coágulo, en nuestro medio, la sangre de los animales se coagula entre 20-30 minutos, sin embargo lo mas recomendado es esperar 1-2 horas a temperatura ambiente, cuanto más tiempo se deje para que esta retracción tenga lugar, mayor cantidad de suero se obtendrá, aunque la cantidad de suero no será nunca mayor de un 40% del volumen original de sangre. Se retira el *suero* del contacto con las células, para impedir que se alteren los resultados de laboratorio (2,3).

2.4.1.- Plasma

El tubo que contiene sangre más anticoagulante se debe centrifugar a 1500 - 2000 r.p.m. durante 10-15 minutos para separar las células del plasma. El plasma que constituye la capa más externa, se puede extraer entonces empleando una pipeta Pasteur o un cuenta gotas, y se transfiere a un tubo de almacenamiento. Se debe tener mucho cuidado para no alterar la capa celular, por lo que la pipeta no se debe poner demasiado cerca de la capa de células ya que la succión puede alterar y extraer cierto numero de células de la superficie que podrían alterar las determinaciones bioquímicas. Para esto se recomienda centrifugar nuevamente este sobrenadante y repetir el paso anterior, obteniendo el plasma con menos células interferentes (8,11).

2.4.2.- Suero

El tubo que contiene sangre sin anticoagulante se debe centrifugar a 1500 r.p.m. durante 10 minutos para separar las células del suero. Luego con una pipeta Pasteur se debe separar el suero o sobrenadante y transferir a un tubo de almacenamiento para la realización de las diferentes pruebas.

La separación del suero del coágulo es generalmente mucho mas sencilla, cuando se emplean recipientes de vidrio, o de poliestireno especialmente tratados, puesto que el coagulo se retrae con suavidad de las paredes del frasco o del tubo y eventualmente queda como una pequeña protuberancia en la base, entonces el suero se puede verter o aspirar fácilmente con pipeta y transferir a un tubo para almacenamiento. También se recomienda como en el caso del plasma, centrifugar nuevamente el suero y obtenerlo libre de células que pueden interferir en las determinaciones (3).

2.5.- Conservación de muestras

Si la muestra no es evaluada en 4-6 hrs., debe separarse el coágulo y refrigerarse el plasma o suero (2).

Las muestras de suero o plasma previamente separadas de las células, pueden conservarse a temperatura ambiente (20-30°C) durante un día sin que se deterioren, en la parte refrigerada de un frigorífico (4°C) durante 4 días; en el congelador (-15 a -20°C) durante una semana o indefinidamente (3).

Las muestras por congelar deben de colocarse de inmediato en baño frío, centrifugarse, transferirse a un tubo de plástico y congelarse (2).

Las muestras congeladas deben descongelarse lentamente hasta la temperatura ambiente, y las muestras descongeladas se deben mezclar completamente por inversión. De esta manera se conservaran mejor los metabolitos, se obtendrán resultados mas acertados y diagnósticos más exactos (3).

2.6.- Transporte de muestras

Para el transporte, las bolsas de hielo o los tubos de muestra deben envolverse en toallas de papel u hojas de diario, a fin de evitar el contacto directo y la consecuente hemólisis (4).

2.7.- TIEMPO DE COAGULACIÓN

Objetivo

Determinar el tiempo de coagulación y sus valores normales, así como su importancia para la detección de enfermedades.

Introducción

El tiempo de coagulación de sangre total es una de las pruebas llamadas globales y abarca la activación intrínseca de la protrombina y el fibrinógeno (11, 45).

La sangre, al ser extraída sin mayor contaminación con tromboplastina tisular, es capaz de coagular cuando se le deposita en un tubo de vidrio. El tiempo que tarda este proceso está en relación con el sistema de precoagulantes e inhibidores fisiológicos o adquiridos, que influyen en la formación de dicho coágulo (13).

Este tiempo de coagulación *in vitro* reflejará mejor la eficacia del sistema *in vivo*, cuanto menos se modifique esta sangre (contacto con el vidrio, burbujas de aire, detergentes, etc.) (32,56).

Materiales

- 3 Tubos de vidrio, perfectamente limpios.
- Baño a 37°C.
- Cronómetro.

Métodos

- 1.- Obtener 3 ml de sangre por punción venosa, de primera intención y con jeringa plástica.
- 2.- Disparar el cronómetro en el instante en que la sangre venosa se introduce en la jeringa.
- 3.- Desconectar la aguja y vaciar ordenadamente 1 ml de sangre en el primero de los tres tubos de vidrio perfectamente limpios, previamente colocados en gradilla de baño a 37°C.
- 4.- Inclinar el primer tubo cada 30 seg. Por la misma cara hasta que la sangre se coagule (deja de escurrirse por las paredes del tubo).
- 5.- De inmediato, inclinar el segundo tubo hasta que se coagule; luego, proceder de la misma forma con el tercer tubo.
- 6.- Se toma como tiempo de coagulación el valor obtenido en el tercer tubo.

Interpretación de resultados

Valores de referencia a 37°C: 7-15 min (8,17).

El rango normal debe establecerse en cada laboratorio, con un grupo suficiente de controles (20 como mínimo). Conviene repetir un paciente normal semanalmente, para determinar cualquier variabilidad de los valores previamente obtenidos.

Se considera alargado un tiempo de coagulación que difiere en más de 2 min del límite superior del rango normal, establecido en cada laboratorio (media \pm 2 SD).

Se trata de un método poco sensible, pues se prolonga sólo en aquellos casos de déficit graves. Un tiempo de coagulación normal no descarta la existencia de un trastorno de la coagulación, pero un tiempo prolongado es siempre índice de un defecto severo de la misma, que puede deberse a una deficiencia de cualquiera de los factores que intervienen en la formación del coágulo de fibrina, con excepción de una deficiencia pura de los factores VII y XIII; pero el método es mucho más sensible a los defectos de los factores que intervienen en la activación por contacto y en la formación del activador intrínseco de la protrombina.

2.8.- RETRACCIÓN DEL COAGULO

Objetivo

Realizar el análisis de retracción del coágulo y la importancia de éste para la coagulación sanguínea.

Introducción

La retracción del coágulo depende de la actividad trombotinámica de las plaquetas, por lo que se requiere un número mínimo de plaquetas normales y adecuados niveles de Ca^{++} . (27, 42)

Material

- Se utilizaran los tres tubos que se ocuparon en la técnica de tiempo de coagulación.

Métodos

1.- Los tres tubos utilizados para determinar el tiempo de coagulación deben dejarse en baño a 37°C durante por lo menos 3 hrs. Al cabo de este tiempo, observaremos la mejor retracción de los tres tubos, graduando de acuerdo a la magnitud de la retracción por apreciación visual del tamaño del coágulo retraído y el suero libre en:

- a) Normal o completa
- b) Incompleta
- c) No retrae
- d) Hiper-retráctil

Interpretación de resultados

Esta prueba depende del número de plaquetas, su actividad funcional y de la concentración de fibrinógeno, aunque no se relacione muy bien con el número de plaquetas (en ciertas condiciones da normal aún con $30.000/\text{mm}^3$). Un aumento importante de fibrinógeno reducirá la retracción por efecto de volumen, mientras que lo opuesto ocurre en casos de hipofibrinogenemia. (13,18)

En la tromblastenia de Glanzman (alteración funcional) se observan retracciones incompletas o nulas. (6,17)

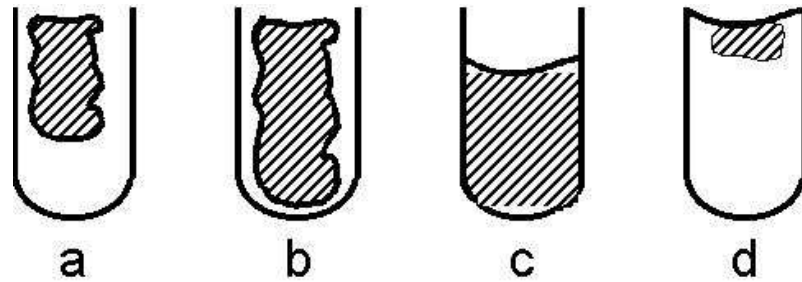


Figura 2.8.1.- Formas de retracción del coágulo (16,17)

2.9.- HEMATOCRITO SEGÚN WINTROBE (macrohematocrito)

Objetivo

Realizar la determinación de hematocrito e interpretar los resultados obtenidos del análisis del mismo.

Introducción

El hematocrito es la cantidad y proporción relativa entre los glóbulos y el plasma sanguíneo. Si bien este parámetro debe ser visto a la luz del resto de los parámetros presentes en hepatología y en la hematimetría junto con la sintomatología del paciente, por sí sólo puede ser ya indicativo de variaciones en las características sanguíneas. Su disminución puede indicar una reducción en el número de hematíes (anemia) y su aumento la situación opuesta (policitemia). (32, 51)

Fundamento

Tras una centrifugación de la sangre total se pueden apreciar dos niveles, uno con el depósito de los glóbulos rojos, principalmente, y otro nivel del plasma total. La relación porcentual entre ambos es lo que describe el hematocrito y describe el porcentaje de células transportadoras de oxígeno con respecto al volumen total de sangre. (1, 13)

El análisis del hematocrito se realiza normalmente en un estudio completo de hematimetría, con el recuento de glóbulos rojos o hematíes.

Material

- Tubo de Wintrobe que tiene 11.5 cm de largo x 3 mm de luz (hueco). Para el microhematocrito se usa el tubo capilar.
- Pipeta Pasteur larga o pipeta para llenado de hematocrito.
- Centrífuga.
- Sangre capilar (micro) o venosa (macro) con anticoagulante.

Métodos

- 1.- Homogeneizar perfectamente la sangre haciendo girar el tubo.
- 2.- Utilizando la pipeta Pasteur se llena de sangre el tubo de Wintrobe exactamente hasta 10, no deben quedar burbujas de aire en el tubo.
- 3.- Centrífugar a 3600 r.p.m durante 30 min. (18)

2.10.- HEMATOCRITO (microhematocrito)

Objetivo

Realizar el análisis del microhematocrito y los resultados obtenidos de éste.

Introducción

El índice hematocrito es el volumen que ocupan las diferentes porciones que se forman al centrifugar un tubo de sangre previamente hecha incoagulable por la adición de oxalato potásico o citrato sódico. La parte corpuscular por ser más densa queda en el fondo del tubo, mientras que sobrenada la fracción plasmática. La cantidad y proporción relativa de cada una de estas partes se denomina valor o índice hematocrito. (32,51)

Material

- Tubos capilares para hematocrito.
- Plastilina o mechero para sellar un extremo del capilar.
- Centrífuga de alta velocidad (8.000 – 12.000 r.p.m) o para microhematocrito.
- Lector de tubos de microhematocrito o regla.
- Sangre capilar o venosa con anticoagulante.

Métodos

- 1.- Mezcle la muestra de sangre.
- 2.- Llene aproximadamente 2/3 de un tubo capilar con la muestra.
- 3.- Selle un extremo del tubo capilar con plastilina o con la llama del mechero.
- 4.- Colocar en el plato de la centrífuga
- 5.- Centrifugar entre 3 y 5 minutos 11,500-15000 r.p.m.
- 6.- Leer la altura del plasma y de los paquetes de hematíes con el lector de tubos o la regla. (9,19)

2.11.- RECUENTO DE ERITROCITOS

Objetivo

Determinar si el paciente presenta una deficiencia de glóbulos rojos causa de una enfermedad, así como prevenir cualquier anomalía que se presente en la muestra del paciente.

Introducción

Cuando la eritropoyésis tiene lugar normalmente, su resultado final es la producción de una célula–eritrocito perfectamente diferenciada y apta para su función principal que es la de transportar oxígeno y CO₂. La falta de núcleo le confiere la virtud de acarrear el oxígeno sin consumir prácticamente nada de él; su forma bicóncava es la que mejor se presta para afrontar la hemólisis; su membrana no admite la salida de hemoglobina. (41, 46)

El recuento de eritrocitos es uno de los métodos de rutina. La condición previa de todos los métodos de recuento es la dilución programada y preparación de una muestra de sangre. Se recuenta el tipo de célula deseado en un volumen definido y se calcula el número de células en un microlitro de sangre. (19, 25)

Fundamento

Al diluir la sangre con una solución salina fisiológica al .9% o líquido de Hayem permite observar y conservar los eritrocitos para su estudio separando los leucocitos.

Material

- Sangre capilar o venosa con anticoagulante
- Pipeta para eritrocitos calibrada
- Cámara de Neubauer
- Boquillas
- Gasas
- Microscopio
- Gradilla

Reactivo

- Reactivo de Hayem para microscopia o Sol. Salina fisiológica.

Métodos

Las pipetas están constituidas por dos porciones capilares y un bulbo central. El tubo capilar inferior está dividido en 10 partes iguales con marcos de 0.5 y 1.0.

En el interior del bulbo existe una perlita de plástico (roja), para favorecer la mezcla de la sangre con el líquido y en el capilar superior hay una marca 101. (18)

Llenado de la pipeta

- 1.- Aspirar sangre en una pipeta de mezcla para eritrocitos calibrada hasta la marca 0.5 (o 1.0 en caso de anemia grave).
- 2.- Se limpia cuidadosamente con gasa la parte externa de la pipeta.

3.- Aspirar sin formación de burbujas el reactivo de Hayem hasta la marca 101. En caso de sangre fresca puede haber coagulación, por lo tanto se debe trabajar rápido. En la pipeta de mezcla se produce una dilución de 1:200 (o resp. 1:100).

4.- Agitar vigorosamente la pipeta durante 1-2 minutos para mezclar perfectamente la sangre con el reactivo. (20, 23)

Llenado de la cámara de recuento

1.- Antes de llenar la cámara de recuento colocar de tal manera un cubreobjetos esmerilado óptimamente que sean visibles los anillos de Newton.

2.- Desechar las primeras 4–5 gotas de la pipeta y llenar la cámara por uno de los bordes del cubre hematímetro.

3.- Se deja que el líquido penetre lentamente entre la cuadrícula y el cubre hematímetro hasta que la plataforma de recuento este completamente cubierto.

4.- Para la medición paralela llenar también el lado opuesto de la cámara de recuento, dejar pasar 3 minutos para que sedimenten los eritrocitos.

5.- Si son visibles burbujas de aire o ha entrado líquido en las ranuras a través de los bordes, entonces debe limpiarse la cámara y llenarse de nuevo. (25, 28, 30)

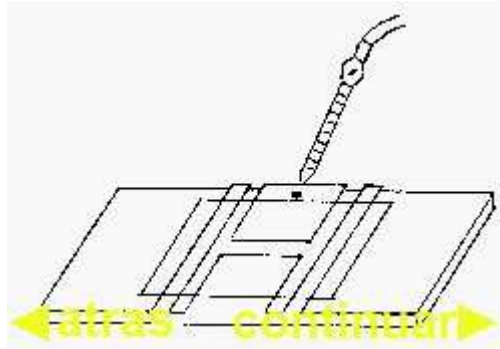


Figura 2.11.1.- Llenado de la cámara de Neubauer (5)

Recuento en el microscopio

- 1.- Poner la cámara de recuento sobre la platina y colocar una de las dos redes de recuento en el centro de la imagen.
- 2.- Hacer el recuento con objetivo 40x en 80 de los cuadrados mínimos o básicos = $1/5 \text{ mm}^2$ en el centro de la llamada red Thoma, y poner cuidado en que haya una distribución uniforme de los eritrocitos.
- 3.- En el recuento considerar solamente los eritrocitos que se encuentren claramente en el cuadrado agrupado (corresponde a 16 cuadrados básicos y 2 líneas de limitación en forma de L, p. ej. abajo y a la izquierda).
- 4.- La superficie total se compone de 5 cuadrados agrupados, que no deberían ser adyacentes.
- 5.- Finalizado el recuento se procede a la limpieza de la pipeta con acético 1:3, agua destilada y alcohol-éter sucesivamente. (25, 38,)

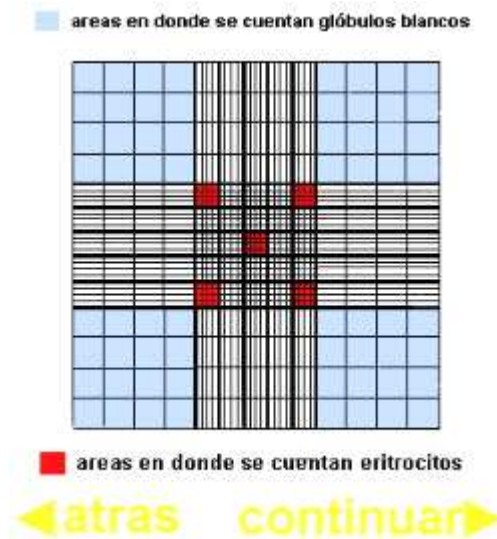


Figura 2.11.2.- Observación de la cámara de Neubauer al microscopio y de las áreas donde se lleva acabo el recuento de eritrocitos y glóbulos blancos (12).

Cálculo

$$\begin{aligned}
 \text{Número de eritrocitos} &= \frac{x \cdot V \cdot 4.000}{80} \\
 &= x \cdot 10.000 \text{ (células}/\mu\text{l)} \\
 &\quad (V= 200) \\
 &= x \cdot 5.000 \text{ (células}/\mu\text{l)} \\
 &\quad (V= 100) \\
 &= x \cdot 0,01 \text{ [células/ p]} \\
 &\quad (V= 100)
 \end{aligned}$$

V = factor de dilución (200 o resp. 100)

X = número de eritrocitos encontrado en 80 de los cuadrados más pequeños.
(12, 18 ,22)

2.12.- RECUENTO DE LEUCOCITOS

Objetivo

Determinar si el paciente presenta una deficiencia de glóbulos blancos causa de una enfermedad así como también para prevenir cualquier anomalía que se presente en la muestra del paciente.

Introducción

La leucopoyésis es un proceso que se lleva a cabo con gran actividad, ya que si el número de granulocitos circulantes de ninguna manera es comparable al de los eritrocitos, en cambio se estima que la sobrevivencia de los neutrófilos no excede de 5 días, de las cuales solo pasan 10 hrs. en la sangre circulante. (9, 20)

El recuento de leucocitos es uno de los métodos de rutina. La condición previa de todos los métodos de recuento es la dilución y preparación programadas de una muestra de sangre.

Fundamento

El ácido acético contenido en la solución de Türk hemoliza los eritrocitos y el colorante contenido tiñe los leucocitos. Se recuenta el tipo de célula deseado en un volumen definido y se calcula el número de células en un microlitro de sangre. (8, 24, 40)

Material

- Sangre capilar o venosa con anticoagulante
- Pipeta para leucocitos (con bola de mezcla blanca) o de Thoma.
- Cámara de Neubauer
- Microscopio
- Boquillas
- Gasa
- Gradilla

Reactivo

- Solución de Türk para microscopia

Métodos

1.- Se toma el tubo de ensayo a presión con la muestra y se destapa cuidadosamente para que no se derrame.

2.- Se coloca la boquilla en la pipeta revisando que ésta no tenga una rotura o que se salga el aire entre la pipeta y la boquilla.

3.- Se inclina el tubo de ensayo alrededor de unos 70° para que la sangre se escurra hasta el borde o casi el borde del tubo de ensayo, se mete ligeramente la pipeta en el tubo sin tapar la graduación de la misma.

4.- Aspirar sangre hasta la marca 1.0, seguidamente aspirar solución de Türk hasta la marca 11. La dilución es 1:10.

Nota: También es posible una dilución de 1: 20 (sangre hasta la marca 0.5 y solución de Türk hasta la marca 11).

- 5.- Mezclar cuidadosamente la sangre y la solución de Türk, durante 3 minutos.
- 6.- Desechar las 3 primeras gotas del líquido, llenar la cámara de Neubauer y efectuar el recuento de leucocitos.
- 7.- El recuento se realiza con objetivo 10x, en microscopios antiguos con condensador bajado, cuya lente frontal esté desplegada.
- 8.- Se cuentan los 4 grandes cuadrados de las esquinas, de 1 mm de lado cada uno.
- 9.- Se recomienda hacer siempre determinaciones dobles cuyos resultados no deben diferir más del 15 %. (37, 38)

Cálculo

$$\frac{M \times 10 \times d}{N} = \text{N}^{\circ} \text{ de leucocitos/ mm}$$

Cuadro 2.12.1.- Fórmula de cálculo de recuento.

Donde: M = número de leucocitos contados en n (4) cuadrados de 1 mm de superficie y d = dilución utilizada. (14, 15, 17, 18,19)

2.13.- RECuento DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS

El recuento diferencial de leucocitos así como el recuento total se debe realizar siempre que la historia clínica o el examen físico revelen anormalidades que puedan alterar la fórmula leucocitaria. Estos exámenes son de utilidad en los animales que presentan enfermedad general o localizada en algún sistema específico.

Los resultados obtenidos también sirven para orientar el tratamiento. Los datos obtenidos en el laboratorio nos revelan:

- 1.- Susceptibilidad del huésped.
- 2.- Virulencia del organismo infectante.
- 3.- Naturaleza y gravedad del proceso patológico.
- 4.- Respuesta general del individuo.
- 5.- Duración de la enfermedad.

2.13.1.- Frotis de sangre

El examen de sangre periférica es uno de los procedimientos de laboratorio que más información proporciona. Tiene valor particular para ayudar al diagnóstico y pronóstico de infecciones agudas, generalizadas o localizadas. Se pueden diagnosticar enfermedades de la sangre, como es el caso de la leucemia; también proporciona información con relación a los eritrocitos y anemia, enfermedades parasitarias como la piroplasmosis, anaplasmosis, tripanosomiasis, etc.; pueden diagnosticarse mediante un frotis.

El frotis debe de hacerse lo más pronto posibles después de extraer la sangre ya que la viabilidad de los leucocitos y otras células sanguíneas disminuye rápidamente.

La extensión de sangre puede realizarse sobre un portaobjetos o un cubreobjetos, siendo más utilizados los primeros.

2.13.1.1.- Preparación del frotis sanguíneo

1.- la sangre deberá mezclarse agitando suavemente o mediante un agitador. Después con un aplicador se coloca una pequeña gota en uno de los extremos del portaobjetos, el cual debe de estar sobre una superficie sólida y plana.

2.- Se coloca el extremo de un segundo portaobjetos (extensor) contra la superficie del primero, sosteniéndolo a un ángulo de aproximadamente 30°.

3.- El portaobjetos se desliza suavemente para extender la gota de sangre; cuando ésta se haya extendido aproximadamente dos tercios del ancho del portaobjetos, por acción capilar se mueve hacia delante con un movimiento firme y uniforme. La sangre correrá formando una película delgada.

El grosor del frotis dependerá del tamaño de la gota, del ángulo del portaobjetos extenso y de la velocidad en que se realice.

4.- El frotis se seca rápidamente, ya que en caso de hacer un secado lento se produce crenación de los eritrocitos.

5.- Para obtener una mejor tinción deberá realizarse este proceso antes de una hora. Cuando la extensión pueda teñirse en un tiempo razonable se deberá preservar con alcohol métilico absoluto. A este último proceso se le denomina fijación y su acción es la de solidificar las células y evitar su degeneración autolítica.

2.13.1.2.- Tinción del frotis

Se pueden usar diversos colorantes y diferentes técnicas. La mayor parte son de tipo Romanowsky, que utilizan colorantes ácidos y básicos derivados de la anilina para contrarrestar los colores azul y rojo. Los más conocidos de este tipo son el de Wright y Giemsa. El colorante Wright Leishman es excelente para el trabajo cotidiano del laboratorio.

2.13.2.- Tinción de Wright

1.- colocar el portaobjetos en una rejilla para coloración y agregar suficiente colorante hasta cubrir el portaobjetos.

2.- Dejar que el colorante actúe de 1 a 3 minutos. El tiempo óptimo deberá ser establecido para cada lote de colorante.

3.- Agregar una cantidad igual de agua destilada o un amortiguador y mezclar perfectamente soplando sobre el portaobjetos hasta que aparezca un brillo metálico sobre la superficie de la mezcla decolorante-amortiguador.

4.- Dejar que el colorante diluído actúe de 2 a 5 minutos. Este tiempo también deberá estar determinado por cada lote, ya sea comercial o preparado en el mismo laboratorio.

5.- Quitar el sobrenadante y lavar con agua corriente o de preferencia agua destilada. El lavado se realizará lo más pronto posible. Un lavado excesivo puede llegar a desteñir el frotis.

2.13.3.- Técnica de Giemsa

1.- Fijar el frotis de sangre con alcohol métilico absoluto, de 3 a 5 minutos, y dejar secar al aire.

2.- Llenar un vaso de coplin con la solución preparada con el colorante de Giemsa, añadiendo una gota de colorante por cada mililitro de agua destilada, de manera que cubra completamente el portaobjetos.

3.- Coloque el portaobjetos fijado y seco en colorante diluído y dejarlo durante 30 minutos.

4.- Lavar el portaobjetos con agua destilada y secar al aire.

2.13.4.- Examen del frotis sanguíneo

El examen del frotis sanguíneo se observa con el objetivo de menor aumento para ver la distribución de las células y seleccionar la parte del frotis que este cerca del extremo más delgado donde los eritrocitos no se sobreponen. Después se cambia el objetivo de inmersión en aceite, sobre todo para identificar las células con mayor precisión.

A los eritrocitos se les estudia su tamaño, forma, color, presencia de formas anormales.

Con relación a la cuenta leucocitaria diferencial ésta se realiza contando y clasificando por lo menos 100 leucocitos. Cuando la cuenta total de leucocitos esta muy elevada o cuando existe una distribución anormal deberán contarse más.

Para tener una muestra representativa de todas las porciones del frotis el examen se realiza de la siguiente manera. Se empieza con el examen a lo largo del margen externo del frotis por aproximadamente 3 campos, se mueve un poca hacia dentro (1mm o 3 campos), luego se mueve en forma paralela al margen por 3 campos y posteriormente hacia a tras a la orilla del frotis, esto es en forma greca.

A los leucocitos se les observa: tamaño, su citoplasma (color, cantidad relativa, gránulos) su núcleo (forma, color, estructura de la cromatina, nucleolos).

La cuenta diferencial de los leucocitos se expresen en porcentaje o sea el número relativo de los diferentes tipos de leucocitos que se encuentran en la sangre.

Con respecto a los trombocitos (plaquetas) el número presente se estima como normal, aumentado o disminuído. Se considera como normal la observación de 4 o más trombocitos por campo. Debe considerarse también su tamaño y morfología. (57)

2.14.- RECUENTO DE PLAQUETAS

Objetivo

Realizar las pruebas correspondientes a la sangre para saber el estado de salud de un paciente, así como conocer los trastornos y complicaciones que puede traer una deficiencia en la sangre. (10)

Introducción

Las plaquetas son fragmentos de una célula llamada megacariocito, se encuentran unas 250 mil x mm³, su vida media es de 9.5 días, sus funciones principales son: coagulación y mantener la integridad de las paredes de los vasos. (15, 34)

Miden de 3–4 micras de diámetro, son redondeadas, se pueden observar con una tinción azul de cresil brillante, no tienen núcleo; el número de plaquetas es el resultado del equilibrio entre el número de plaquetas producidas en la médula ósea y las utilizadas, también de la pérdida o destrucción de la sangre periférica.

Fundamento

El recuento de plaquetas se efectúa en sangre obtenida de punción venosa anticoagulada con EDTA, y sometida a hemólisis por acción de una solución hipotónica de oxalato de amonio en agua destilada. (49, 53)

La solución hipotónica produce el lisado de los hematíes y la procaína inhibe la adhesividad de las plaquetas, conservando su morfología y permitiendo su recuento en cámara. (12, 19)

Material

- Sangre venosa con EDTA al 10%
- Tubo de ensayo de 13 x 100ml
- Pipeta de Thoma para glóbulos rojos
- Cámara de Neubauer
- Caja de petri
- Papel filtro
- Algodón
- Microscopio
- Gradilla

Reactivos

- Colorante de azul de cresil brillante

Método

- 1.- Aspirar sangre en una pipeta para diluir eritrocitos hasta la marca de 0.5.
- 2.- Aspirar el líquido diluyente hasta la marca de 101, de manera similar a la cuenta de los eritrocitos.
- 3.- Mezclar cuidadosamente la sangre y la solución dejar en reposo la pipeta durante 5 minutos, entremezclar brevemente otra vez.
- 4.- Tirar las primera 3-5 gotas.
- 5.- Cargar la cámara de Neubauer.
- 6.- Dejar reposar 5 minutos, en una caja de petri con papel filtro húmedo.
- 7.- Hacer el recuento con objetivo 40x en 5 de los cuadrados agrupados de tamaño medio del centro de la cámara, cada uno de estos cuadrados medios está compuesto de 16 cuadrados básicos = 80 de los cuadrados más pequeños con un volumen de cámara de 1/4000 μ l en cada caso.

Nota: Los trombocitos (plaquetas) redondos se reconocen al enfocar por su brillo "sedoso" característico.

Cálculo

$$\text{Número de trombocitos} = \frac{x.V. 4.000}{80} = x.5000 \text{ [células/}\mu\text{l]} \text{ (V=20)}$$

V = factor de dilución (20 o resp. 100)

X = número de trombocitos encontrado en 5 cuadrados agrupados (= 80 de los cuadrados más pequeños). (13, 16)

2.15.- FROTIS SANGUÍNEO

2.15.1.- Preparación del frotis sanguíneo (Método de extensión)

1.- Deben usarse portaobjetos para microscopio nuevos, de preferencia con los bordes biselados.

- ♦ Para evitar la producción de artefactos en los eritrocitos, el porta objetos nuevo deberá sumergirse en alcohol al 95% y secarse con un lienzo limpio. (29, 33)

2.- Lo ideal es hacer los frotis con sangre fresca, recién extraída, para que no haya necesidad de agregarle anticoagulante, ya que este tiende provocar la distorsión de las células.

- ♦ Cuando se agrega EDTA, los portaobjetos deberán prepararse en los 15 minutos siguientes a la obtención de la muestra de sangre.

- La sangre deberá mezclarse bien agitando suavemente o utilizando un agitador manual, antes de usar el tubo capilar o el aplicador para colocar una pequeña gota en uno de los extremos del portaobjetos, el cual debe de estar sobre una superficie sólida y plana.

a) Cuando se usa portaobjetos con los extremos congelados, la gota debe colocarse sobre el vidrio liso que está hacia el extremo congelado.(12, 16)

3.- Se coloca el extremo de un segundo portaobjetos (portaobjetos para extender) contra la superficie del primero, sosteniéndolo a un ángulo aproximadamente 30° . (34)

4.- El portaobjetos se desliza suavemente para extender la gota de sangre; cuando esta se haya extendido sobre aproximadamente 2 tercios del ancho del portaobjetos, por acción capilar se mueve hacia delante con un movimiento firme y uniforme. La sangre correrá formando una película delgada.

- ♦ El grosor de la película irá disminuyendo del principio hacia la cola o extremo escarchado; la parte adyacente a la cola por lo general es el área que adquiere el grosor ideal por que las células no se distorsionan en el área delgada.
- ♦ El grosor del frotis dependerá del tamaño de la gota, del ángulo del portaobjetos para extender y de la velocidad con la cual se esparce.
- ♦ Si se coloca en el portaobjetos una gota de sangre demasiado grande, puede quedar gran parte detrás de él, si después de esparcirla por detrás del portaobjetos para extender éste se levanta y se coloca más adelante antes de terminar de extender la sangre. (23, 26, 29)

5.- La preparación se seca rápidamente ondeándola en el aire o usando un ventilador si el clima es húmedo.

- ♦ Una causa de crenación de los eritrocitos es el secado lento de la película de sangre por que el agua se mueve de los eritrocitos al plasma.
- ♦ No debe usarse calor para el secado.

6.- Para logra mejores resultados la tinción deberá hacerse antes de una hora.

- ♦ Si la laminilla no puede teñirse en un tiempo razonable, deberá preservarse por medio de la fijación en alcohol métilico absoluto. (30, 37, 38)

2.16.- SERODIAGNÓSTICO EN BRUCELOSIS

Las pruebas serológicas son de fundamental importancia para el diagnóstico de numerosas enfermedades infecciosas. En el caso de Brucelosis, las pruebas de serodiagnóstico presentan algunas limitaciones, como son: dificultad de detectar la infección durante el periodo de incubación (infecciones recientes), en estados crónicos de la enfermedad, los títulos de anticuerpos son frecuentemente irregulares, ya que caen a niveles bajos y fluctúan durante periodos indefinidos. Particularmente en Brucelosis, se presenta la dificultad de distinguir anticuerpos producidos por infección natural de aquellos anticuerpos producidos por reciente vacunación.

Las inmunoglobulinas que se encuentran en el suero de los bovinos tienen algunas características en común con las inmunoglobulinas del hombre, sobre todo las IgG, IgM e IgA. En los bovinos se han encontrado 2 subclases de inmunoglobulinas G: la IgG₁ y la IgG₂ las cuales presentan diferentes propiedades biológicas.

El objetivo de estas prácticas es conocer e interpretar las técnicas más usadas en el diagnóstico serológico de brucelosis. Se describen la prueba de aglutinación rápida en placa; aglutinación lenta en tubo; anillo en leche; rivanol y prueba de fijación de complemento. Además se mencionarán otras pruebas, como rosa de bengala

2.16.1.- PRUEBA ROSA DE BENGALA (TARJETA O CARD-TEST)

La prueba se basa en la inhibición de algunas aglutinaciones inespecíficas a pH bajo. Se emplea un antígeno corpuscular de 8% de concentración célula en una solución tope a pH 3.65.

El método tuvo su origen en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. En la actualidad existen firmas norteamericanas y europeas que lo comercializan con algunas variantes de nombres y equipos, algunos de ellos amparados por patentes internacionales.

Reactivos y Equipos Necesarios

- a) Las Casas Comerciales suministran equipos completos con instrucciones detalladas.
- b) Con algunas restricciones, la prueba se puede realizar con las láminas de vidrio y las pipetas de la prueba de aglutinación en placa.
- c) Antígeno Rosa de Bengala.

Técnica

En líneas generales, la prueba se realiza en la forma siguiente:

- a) Colocar 0,03ml de plasma o suero problema sobre uno de los cuadrados de la lámina de vidrio (o tarjeta de cartón, lámina de plástico, etc.).

- b) Colocar una gota (0,03 ml) de antígeno Rosa de Bengala (de Card-Test) cerca de la gota del suero.
- c) Mezclar bien el suero y el antígeno utilizando un agitador o mondadientes distinto para cada muestra. La superficie ocupada por la muestra debe tener un diámetro de 23 a 24 mm.
- d) Hacer girar la lámina o tarjeta durante 4 minutos a razón de 10-12 movimientos por minuto. Esto se puede hacer en forma manual o con rotadores diseñados especialmente.
- e) El resultado de la prueba se lee a los 4 minutos sobre un fondo blanco. Las reacciones positivas presentan grumos de aglutinación, que pueden ser grandes o pequeños.
- f) La prueba es cualitativa, por lo que el resultado se informa como positivo o negativo.

Interpretación

En animales que nunca fueron vacunados, la reacción positiva es un indicador de infección muy probable.

Es aconsejable utilizar la prueba como tamiz y someter los sueros que presentan algún tipo de reacción a una prueba confirmatoria como, por ejemplo, la de aglutinación lenta o la de fijación de complemento.

Precauciones

- a) El antígeno debe mantenerse en refrigeración a una temperatura de 4° a 8°C se debe evitar su congelación, porque queda inutilizado para la prueba.
- b) Tanto el antígeno como el suero deben mantenerse a temperatura ambiente por lo menos una hora antes de realizar la prueba.
- c) Los goteros deben lavarse con agua destilada al terminar la jornada de trabajo. (57)

2.16.2.- ANTÍGENO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS ANIMAL PRUEBA EN PLACA, RÁPIDA O DE HUDDLESON

La prueba de aglutinación en placa para el diagnóstico de Brucelosis ha demostrado su eficacia como prueba a campo y sus resultados son comparables a otras pruebas de laboratorio cuando su técnica de ejecución e interpretación se realizan según normas estándar internacionales.

Indicaciones:

Manejo del Antígeno:

Debe conservarse a temperatura entre 4° – 8° centígrados. Si por accidente se congelara debe ser eliminado. Cuando no se utiliza debe permanecer tapado pues la evaporación o la introducción de elementos extraños modifica su concentración desvirtuando los resultados. Sueros y antígenos deben ser utilizados a temperatura ambiente.

Aglutinoscopio:

Fabricado en madera. Medidas: largo 45 cm. ancho 35 cm., alto 15 cm., con visera de 13 cm. en la parte anterior. Para evitar la evaporación de las pruebas es conveniente colocarle tapa (marco y vidrio). La placa (vidrio) estará dividida en cuadrados de 4 x 4 cm., medida muy importante para permitir la extensión y diámetro de cada dilución, debajo de la visera llevará una fuente de iluminación. De esta forma la luz es incidente y permite una buena lectura.

Pipetas:

Deben utilizarse pipetas aforadas especiales con divisiones para cada dilución o en su defecto una pipeta Kant de 0.2 ml dividida en centésimas. Deben desecharse las pipetas con la punta rota.

Goteros:

Para agregar el antígeno deben utilizarse goteros calibrados que liberen 0.03 ml. El uso de estos goteros es muy importante para mantener la relación antígeno – anticuerpo.

Técnica de la prueba en placa

1.- El vidrio (placa) previamente limpio debe ser perfectamente desengrasado cada vez con alcohol 96° y bien secado, esto evita que las diluciones modifiquen su diámetro y se deformen.

2.- Colocando la pipeta en ángulo de 45° con respecto a la placa y tocando el vidrio, descargar las cantidades de sueros correspondientes a cada dilución utilizando una fila de cuadrados de arriba a abajo.

3.- Con el gotero calibrado y previa agitación del frasco para homogenizar el antígeno, descargar en posición vertical, una gota de antígeno para cada cuadrado con suero.

4.- Con un palillo se mezcla el suero y antígeno varias veces sin modificar el diámetro y luego se trata con movimientos circulares de llegar a los diámetros correspondientes, se comienza a mezclar de abajo hacia arriba es decir de la dilución mayor a la menor.

5.- Se toma la placa y se hace un suave movimiento de rotación 5 vueltas a la derecha y 5 a la izquierda.

6.- Se vuelve a colocar la placa en el aglutinoscopio y este es el momento que se toma como comienzo de la prueba. A contar de aquí se cuentan los ocho (8) minutos que dura la prueba.

7.- Transcurridos cinco minutos de la iniciación de las pruebas se vuelve a rotar la placa 3 veces en cada sentido. Se apoya la placa en el aglutinoscopio y se que transcurra los tres minutos restantes para hacer la lectura.

CANTIDADES DE SUERO ANTÍGENO Y DIÁMETROS			
Dilución	Cantidad de Suero	Cantidades de Antígenos	Diámetros
1/25	0.08 ml	0.03 ml	27 mm
1/50	0.04 ml	0.03 ml	24 mm
1/100	0.02 ml	0.03 ml	21 mm
1/200	0.01 ml	0.03 ml	18 mm
1/400	0.005 ml	0.03 ml	15 mm

Cuadro 2.16.2.1.- Cantidades de suero antígeno y diámetro.

Lectura de la prueba en la placa

Transcurridos los ocho minutos se procede a la lectura. Para ello se enciende la luz, se inclina la placa hacia adelante y luego lentamente hacia atrás fijándose atentamente en el sedimento que deja la prueba al correr de adelante a atrás. Dicho sedimento se interpreta así en cada dilución:

Líquido uniforme sin grumos, reacción negativa (-). Líquido no tan uniforme, pequeños o medianos grumos, reacción incompleta (I). Líquido límpido, grandes grumos, reacción positiva (+).

La práctica continuada de la prueba ejercita para la buena y justa lectura.

La técnica antes descrita corresponde al estándar internacional y garantiza resultados comparables con otras pruebas serológicas de estricta exactitud pero complicado mecanismo de ejecución.

Los signos utilizados para la interpretación de los resultados. La nomenclatura utilizada en el diagnóstico serológico, tiene carácter de internacional. Como difiere de la habitualmente usada en Ecuador, es conveniente modificarla y adoptar aquella.

Las cruces con que se cuantifica cada dilución significan intensidad de reacción y no identificación de título aglutinante.

Así, una muestra de suero puede merecer una – dos – tres o cuatro cruces, en cada dilución, de acuerdo al tamaño de los grumos y la nitidez del líquido intermedio por ejemplo:

1/25 ++	Grumos apenas perceptibles, liquido turbio
1/25 ++	Grumos más grandes, liquido menos turbio
1/25 +++	Grumos algo más grandes, liquido menos turbio aún
1/25 ++++	Grumos bien grandes, líquido límpido

Cuadro 2.16.2.2.- Interpretación de los resultados

Así para todas las diluciones: 1/50 – 1/100 -1/200 - etc.

La posibilidad de determinar si una dilución es reaccionante a 1 – 2 – 3 cruces, es subjetiva, depende del observador y puede dar lugar a controversias, razón por la cual esa intensidad de reacción se ha resuelto representarla con la letra “I” que significa reacción incompleta y cuando se trata de una reacción 4 cruces se representa con el signo () como reacción completa.

La práctica continuada de la prueba ejercita para una buena y ajustada lectura.

La técnica antes descrita corresponde al estándar Internacional y seguirla estrictamente garantiza resultados comparables con otras pruebas serológicas de específica exactitud, pero complicado mecanismo de ejecución.

Interpretación de los resultados

Bovinos No Vacunados o Vacunados después de los 8 meses				
1/25	1/50	1/100	1/200	Resultados
-	-	-	-	Negativa
	-	-	-	Negativa
+	-	-	-	Negativa
+		-	-	Sospechosa
+	+	-	-	Sospechosa
+	+		-	Sospechosa
+	+	+	-	Positiva
+	+	+		Positiva
+	+	+	+	Positiva

Cuadro 2.16.2.3.- Interpretación de los resultados de bovinos no vacunados o vacunados después de los 8 meses.

Bovinos Vacunados a los 3-8 meses después de los 30 meses de edad				
1/25	1/50	1/100	1/200	Resultados
-	-	-	-	Negativa
	-	-	-	Negativa
+	-	-	-	Negativa
+		-	-	Negativa
+	+	-	-	Negativa
+	+		-	Sospechosa
+	+	+	-	Sospechosa
+	+	+		Sospechosa
+	+	+	+	Positiva

Cuadro 2.16.2.4.- Interpretación de los resultados de bovinos vacunados a los 3-8 meses después de los 30 meses de edad.

(I)	Reacción	Incompleta
(+)	Reacción	Completa
(-) Reacción Negativa (57)		

2.16.3.- AGLUTINACIÓN EN PLACA POR PRECIPITACIÓN POR RIVANOL

Esta prueba fue desarrollada por Anderson (1964) y se basa en que el rivanol (es un colorante de acridina) tiene la habilidad de precipitar las proteínas del suero de bovino, entre ellas las aglutininas “no específicas”. Mediante el uso de cantidades iguales de suero y una solución al 1% de rivanol, que da un precipitado y un sobrenadante; de este sobrenadante se detectan exclusivamente la IgG. Sin embargo, para que la prueba pueda ser efectiva se emplea un antígeno de *Brucella abortus* especial, que es altamente sensible, con el fin de compensar el efecto de la disolución de los anticuerpos.

Material

- 1.- Se requiere del mismo equipo utilizado para la realización de la prueba de aglutinación rápida en placa, donde se incluye la caja incubadora, pipetas bang, removedor múltiple, gotero para el antígeno que libere 0.03 ml, etc.
- 2.- Tubos de ensaye de 13 x 100 ml.
- 3.- Gradillas de alambre.
- 4.- Pipetas serológicas de 1.0 ml graduadas en décimas.
- 5.- Centrífuga.
- 6.- Antígeno de *Brucella abortus* especial para la prueba de rivanol, que contiene 4% de células por volumen y un pH de 5.8-6.2.

7.- Una solución al 1% de rivanol (lactato-2-etoxi-6, 9 diamino-acridina)

8.- Ambos se almacenan en refrigeración 4-6° C.

Procedimiento de la prueba

1.- Sacar los sueros y los reactivos del refrigerador y mantenerlos a temperatura ambiente durante 1 hora.

2.- Colocar los tubos en la gradilla e identificarlos.

3.- Con la pipeta serológica colocar 0.4 ml de la solución de rivanol en cada tubo.

4.- Con una pipeta serológica 0.4 ml de suero en cada tubo con rivanol.

5.- Mezclar inmediatamente agitando el tubo.

6.- Se incuba a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos.

7.- Se centrifugan a 2000 r.p.m. durante 5 minutos.

8.- Con una pipeta de bang se toma el sobrenadante y se coloca en los cuadros de la placa de vidrio las cantidades de 0.08, 0.04, 0.02 y de 0.01 ml.

9.- Se agrega una gota de 0.03 del antígeno a cada dilución y se mezcla con el removedor múltiple o aplicadores de madera, tal como se realiza con la prueba de Huddleson.

10.- Se incuba durante 12 minutos.

11.- Al cabo de los primeros 6 minutos se mueve la placa en forma rotatoria.

12.- Transcurridos los 12 minutos se mueve nuevamente la placa y se realiza la lectura.

Lectura de la reacción

1.- Se efectúa igual que en la prueba de aglutinación rápida en placa.

2.- Las mezclas de sobrenadante y rivanol se denominan diluciones 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, solo que no son verdaderas diluciones pero reciben este nombre para simplificar la comparación de las reacciones de estas pruebas con los resultados de otras.

Interpretación

Es de gran valor cualquier aglutinación, incluso a títulos bajos, para considerar a un animal como reactor positivo.

2.16.4.- PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO

Esta prueba se practica en muchos países para el diagnóstico de brucelosis y es la que ha demostrado ser la más exacta y sensible. En brucelosis bovina, mientras que ambos anticuerpos IgM e IgG fijan el complemento, las IgG₁ es mucho más efectiva que la IgM en la prueba de fijación del complemento. Esta prueba detecta anticuerpos producidos por la vacuna cepa 19 de *Brucella abortus* hasta los 6 meses después de la vacunación, no así las pruebas de seroaglutinación, que continúan detectándolos durante más tiempo. En animales con infección crónica, los niveles de anticuerpos tienden a disminuir con las pruebas de seroaglutinación, mientras que con las pruebas de fijación de complemento los niveles diagnósticos persisten durante mucho tiempo.

Esta prueba es excelente, solo que para llevarla a cabo es necesario que el laboratorio cuente con personal capacitado así como material y equipo adecuado.

Material y procedimientos

1.- Tratamiento de sueros con actividad anticomplementaria.

- a).- Hacer una solución al 5.0% de albúmina sérica bovina (BSA) fracción V y ponerla en el diluyente de la prueba.
- b).- Se puede poner en diluyente una sol. 5.0% de complemento de cobayo.
- c).- Prepare la primera dilución para ser usada en la prueba en esta solución de albúmina (0.2 ml de suero mas 0.8 ml de solución de albúmina).
- d).- Incube en baño maría a 37° C durante 30 a 60 minutos.
- e).- Inactive a la temperatura apropiada para el tipo de prueba que se empezó a usar y proceda con la prueba normalmente.

2.- Interpretación de la prueba.

El punto final de la reacción es tomado como la última dilución que muestra una apreciable fijación (las trazas de hemólisis son ignoradas); esta dilución se toma como el título del suero.

a).- Con el sistema de macro-fijación del complemento (en tubos):

1.- Si son sueros de bovinos, ovinos y caprinos, estos títulos se consideran como reactores positivos (presencia de infección).

2.- Cuando la fijación se realiza en frío (0-4° C/14-18 horas):

Títulos de 1:20.

3.- Cuando la fijación se realiza en caliente (37° C/30 minutos):

Títulos de 1:8

b).- Con el sistema de micro-fijación de complemento (Micro-titer):

1.- Si son sueros de bovino, ovino y caprino, estos títulos se consideran como reactores positivos (presencia de infección)

2.- Cuando la fijación se realiza en frío: títulos de 1:10.

3.- Cuando la fijación se realiza en caliente: título de 1:4.

c).- Es importante que los títulos de fijación de complemento sean expresados en relación al título dado con el segundo PISAB (patrón internacional suero anti *Brucella abortus*) y con el método empleado; por ejemplo, con el sistema de macro-fijación de complemento en frío es de un título de 1:640 y en caliente es de un título de 1:256.

2.16.5.- PRUEBA DEL ANILLO EN LECHE O DE BANG

La prueba de bang (prueba de anillo en leche) para el diagnóstico de brucelosis se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos en la leche de animales infectados; es una prueba que se efectúa en forma correcta tiene mucha sensibilidad, ya que se puede utilizar en leches procedentes de 60 vacas.

Para que esta prueba pueda realizarse y funcione adecuadamente, deberán estar presentes en la leche los siguientes elementos:

- ♦ Anticuerpos contra brucela: son detectados por adición a la leche de un antígeno de brucela teñido con hematoxilina (azul). Estas aglutininas son las responsables de que se agrupen y asciendan a la superficie, pudiendo ser destruidas por el calor y por la agitación violenta de la leche.

- ♦ Antígeno: el antígeno se une con el anticuerpo (si esta presente) formando un complejo, el cual se adhiere al glóbulo de grasa y asciende formando una capa de crema coloreada de azul (anillo de color azul). Si no existen anticuerpos contra brucela el antígeno permanecerá suspendido en la leche, dando un color homogéneo azulado bajo una capa de crema blanca.

Material

Equipo y reactivos para el muestreo.

- 1.- Varillas colectoras de profundidad con capacidad de 6 ml. Estas varillas colectoras poseen un recipiente en forma cilíndrica colocado en un tubo de sus extremos.
- 2.- Tubos de cultivo Pyrex de 16 x 150 mm con tapón de baquelita.
- 3.- Gradillas para tubos Pyrex de 16 x 150 mm con capacidad para 40 tubos.
- 4.-Tela adhesiva o masking tape y marcador.
- 5.-Preservativo para leche. De una presentación comercial de solución de formaldehído 37%, tomar 32 ml y mezclarlos a 3800 ml de agua destilada. A cada tubo para muestra deberá agregarse 1.5 ml de la solución antes preparada, lo que permitirá conservar la leche perfectamente en un periodo máximo de 72 horas en refrigeración.

Equipos y reactivos para la prueba

- 1.- Tubos Pirex de 13 x 100 mm.
- 2.- Gradillas paran tubo de 13 x 100 mm con capacidad para 72 tubos.
- 3.- Pipetas serológicas de 1.0 ml y 5.0 ml de capacidad.

4.- Gotero para liberar 0.03 ml de antígeno.

5.- Toallas de papel absorbentes.

6.- Estufa bacteriológica o baño maría a 37° C.

7.- Antígeno para la prueba de anillo en leche cepa *Brucella abortus* 1119-3 a una concentración 4.5% teñido con hematoxilina.

Procedimiento

El éxito de la prueba de anillo en leche depende en gran parte del manejo al que se somete la muestra, desde la colección hasta el momento en que se realiza la prueba.

Los métodos de manejo de la leche cambian con los avances industriales y mecánicos; por lo tanto, los métodos del muestreo para la prueba de anillo en leche son variables y los técnicos que colectan la muestra deben tener en cuenta los siguientes métodos:

Colección o toma de la muestra.

La varilla de profundidad es el medio más común y práctico para la obtención de la muestra de leche, la cual permite su extracción de la misma en el volumen y limpieza requeridos. Después de la colección de cada muestra deberá enjuagarse la varilla de profundidad con agua tibia.

a).- Muestreo de leche de los botes receptores.

Las muestras de leche deberán ser tomadas de cada bote después de la ordeña o al momento de llegar a la planta pasteurizadora.

Cuando los botes estén en reposo se tendrá cuidado de agitar el contenido con la varilla de profundidad para evitar la extracción de la crema que se acumula en la superficie. Una vez hecho esto se procederá a extraer la muestra desde la basa interior del bote. Obtenida la muestra se pasará a los tubos Pyrex 16 x 150 mm y se identificará con tela adhesiva. La varilla de profundidad deberá enjuagarse con abundante agua tibia, y si quedaran residuos se utilizará un escobillón. Este procedimiento se repetirá entre cada toma de muestra.

b).- Muestreo de leche durante el vaciado de los botes.

La colección de la muestra de leche se realizará durante el vaciado de los botes al tanque receptor de la planta. La muestra es tomada con la varilla de profundidad en porción vertical al momento que se vierte la leche al tanque, evitándose de esta forma la obtención de crema. La varilla de profundidad se deberá enjuagar con abundante agua tibia, y si quedaran residuos se utilizará un escobillón. Este procedimientos se realizará entre cada toma de muestra.

c).- Muestreo de leche de los tanques de almacenamiento.

La muestra de leche puede obtenerse de los tanques de almacenamiento de los establos, y esto no significará ningún problema si es de la misma explotación. En caso de que la muestra sea tomada de los carros-tanque que transportan la leche a las plantas pasteurizadoras, deben tenerse en cuenta las rutas de recolección en zonas de explotación lecheras semi-estabuladas o en pastoreo. Además es necesario de donde y de cuantos animales procede la leche de los carros-tanque. La muestra deberá ser colectada en recipientes de 250 ml de capacidad e identificados perfectamente. En este procedimiento no es práctico para obtener información concreta de una explotación, sino que es muy útil para evaluar toda una zona.

Preservación.

Para evitar la descomposición de la leche es necesario agregar un preservativo al momento de obtener la muestra; generalmente se emplea una solución de formol. El preservativo se depositará en el tubo colector, debiéndose mezclar con la leche mediante una rotación suave o por simple inversión del tubo. La muestra deberá conservarse en refrigeración (temp. 5° C durante un tiempo máximo de 36 horas); para ello existe termos o cajas refrigerantes que cumplen con esta función cuando las muestras son recolectadas a distancia de un laboratorio. Si las muestras son enviadas a laboratorio inmediatamente después de su colección, deberán ser conservadas en refrigeración 12 horas antes de efectuar la prueba.

Prueba estándar del anillo en leche.

Esta prueba se realiza en muestras obtenidas de botes receptores o bien de leches provenientes durante el vaciado de los botes o de pocas vacas ordeñadas.

a).- Las pruebas del anillo deberán realizarse en un lapso no mayor a 72 horas después de ser tomada la muestra y conservada en refrigeración por lo menos durante 12 horas.

b).- La leche y el antígeno deberán permanecer de 30 a 60 minutos a la temperatura ambiente (20-25° C) antes de efectuar la prueba.

c).- Colocar los tubos Pyrex 13 x 100 mm en la gradilla e identificarlos con el número de la muestra problema.

d).- Depositar en los tubos 1.0 ml de la leche problema utilizando para ello las pipetas serológicas de 1.0 o de 5.0 ml.

- e).- Repetir la operación con cada muestra colectada
- f).- Una vez colocada 1 ml de leche en cada uno de los tubos, depositar con el gotero una gota de 0.03 ml de antígeno a todos los tubos.
- g).- Mezclar la leche y el antígeno mediante la inversión del tubo por tres ocasiones, oprimiendo la boca del tubo con el dedo índice, suavemente (no con violencia).
- h).- Repetir la operación con cada tubo no sin antes enjuagarse los dedos con agua destilada y secarlos con una toalla.
- i).- Incubar en estufa bacteriológica a 37° C 30 a 60 minutos; lo mismo se hace si se cuenta con baño maría.
- j).- Hacer la lectura de la prueba como se presenta en el cuadro siguiente

Anillo de crema	Columna de leche	Resultados
Muy coloreado (Azul)	Blanca	+ + + +
Francamente coloreado	Ligeramente coloreada	+ + +
Medianamente coloreado	Ligeramente coloreada	+ +
Mismo color	Mismo color	+
Blanco o ligeramente coloreado	Francamente coloreada	-

Cuadro 2.16.5.1.- Lectura de la prueba del anillo en leche.

k).- Interpretación

Cualquier lectura de 1+ a 4+ como lo indica el cuadro anterior en donde se observa la coloración del anillo se considera positiva a la prueba y se anotará en la hoja de resultados con una "S" que indica sospechoso. Una lectura negativa a la prueba, lo será cuando el anillo de crema se conserve en blanco y se anotara con una "N" de negativo.

Factores que influyen la prueba de anillo en leche.

a).- Muestras incorrectas que contienen excesiva o insuficiente cantidad de crema, la cual afecta la lectura de la prueba.

b).- La excesiva agitación afecta a la crema y por lo tanto también a la prueba.

c).- Excesivo calor o temperaturas de 43 a 45° C durante 5 minutos, disminuye el nivel de anticuerpos contra Brucela.

d).- Tiempo y temperatura de almacenaje. Temperaturas más altas y tiempos más prolongados pueden causar grandes pérdidas de anticuerpos.

e).- Proporción de leche y antígenos utilizados en la prueba.

Reacciones falsas positivas.

a).- Leche de vacas con mastitis puede dar reacciones falsas positivas debido a la disminución de proteínas séricas en la leche; lo mismo sucede por la presencia de células y bacterias en estos casos, lo que hará prácticamente imposible la lectura.

b).- La presencia de calostro puede producir una reacción falsa positiva.

c).- La leche de vacas en periodos de secado puede también producir reacciones falsas positivas.

d).- Si se prueba leche fresca ocasionalmente se tendrán reacciones positivas, las cuales desaparecerán después de la refrigeración. No todos los animales infectados por Brucela tienen infectada la ubre y esto nos conduce a reacciones falsa negativas; así, tenemos animales que dan reacciones negativas a la prueba de anillo en leche, pueden ser reactores positivos a las cero aglutinaciones, y esto puede suceder también en sentido inverso. Lo anterior está demostrado, ya que los anticuerpos de la leche y del torrente sanguíneo funcionan en forma independiente, y dependiendo la localización de las brucelas se podrán detectar los anticuerpos.

III. ANALISIS DE ORINA

Objetivo

Analizar el examen físico, químico y microscópico en una muestra de orina, para aprender conocer y determinar los valores normales del análisis.

Introducción

El análisis rutinario de orina es una medición por métodos físicos y químicos para valorar diferentes parámetros químicos y microscópicos para diagnosticar la presencia de infecciones urinarias, enfermedades renales, y otras enfermedades generales que producen metabolitos en la orina. (47, 50)

Se utiliza para evaluar la función de los riñones, de las diferentes hormonas que lo regulan, y situaciones de la homeostasis de líquidos en los animales.

El análisis de orina se realiza como estudio rutinario para discriminación del estado de salud, para el diagnóstico precoz de diferentes enfermedades, para el control de enfermedades pancreáticas, hepáticas y renales. (30, 31, 40)

Material

- Recipiente para recolección de orina.
- 2 Tubos de ensaye.
- Tiras reactivas para análisis químico de la orina.
- Lector de tiras reactivas.
- Pipeta Pasteur.
- Centrífuga.
- Porta objetos.
- Cubre objetos.
- Microscopio.

Métodos

3.1.- Obtención de la muestra

1.- Los recipientes para la obtención de las muestras deben estar limpios, bien enjuaguados, libres de residuos y desinfectantes.

2.- Los métodos para la obtención de la muestra pueden ser los siguientes:

MICCIÓN:

- La muestra de mitad del chorro se colecta en un recipiente limpio mientras el animal orina. (10,15)

EXPRESIÓN MANUAL:

- Se limpia la vulva o el prepucio, se palpa la vejiga en la parte caudal del abdomen y se aplica presión continua suave.

- Se obtiene la muestra a mitad del chorro en un recipiente limpio.

Precaución: Nunca debe usarse expresión manual en un animal con obstrucción. (7, 15)

CATETERISMO:

- Se limpia la abertura uretral externa.

- Con técnica aséptica se aplica lubricante en la punta de la sonda.

- Se inserta la sonda en la uretra, evitando el contacto con la piel externa y el pelo.

- Se empuja con suavidad la sonda por la uretra hasta alcanzar la vejiga.

- Usando una jeringa estéril se aspira orina; deben eliminarse los primeros 3 a 5 ml debido a posible contaminación. (24, 28)

3.- Se colecta cuando menos 8-10 ml de orina.

4.- La muestra no debe contener epitelio cutáneo o bacterias, secreciones, pelo, pelusa, etc. (1, 2, 27)

3.2.- EXAMEN FÍSICO

El examen minucioso de la orina es un procedimiento diagnóstico muy importante, es un líquido del organismo que se obtiene con facilidad en la mayor parte de las especies.

La orina es el resultado final de un proceso fisiológico complicado pero muy bien controlado. La orina no solo se altera en la enfermedad renal; muchos padecimientos no renales la modifican, y los cambios pueden tener valor diagnóstico. (58)

3.2.1.- Examen macroscópico.

VOLUMEN: La cantidad depende de varios factores entre ellos; dieta, ingestión de líquidos, clima (temperatura y humedad), ejercicio, talla y peso.

En el animal normal, si la orina es muy abundante, casi siempre tiene baja densidad, y si es escasa, ésta será elevada.

El aumento del volumen de orina (poliuria) y la disminución del volumen (oliguria) pueden aparecer en forma transitoria por diversas causas tanto patológicas como no patológicas tal es el caso de diabetes mellitus, etc.

COLOR: El color de la orina se observa con solo depositar una porción de la muestra en un tubo de ensaye o en la probeta del urinómetro.

Incolora	Café amarillenta	Café rojiza
Amarillo pálido	Amarillo verdoso	Café
Amarillo	Verde	Azul
Amarillo obscuro	Rojo	Lechosa

El color normal es de amarilla a ámbar claro y depende principalmente de la concentración de los urocromos, cuya producción es relativamente constante. Los estados fisiológicos que alteran el color de la orina pueden ser debido a la disminución de ingestión de líquidos y patológicos como un estadio terminal de enfermedad renal, por mencionar algunos ejemplos.

TRANSPARENCIA: Se describe según aparece en el tubo de ensayo, generalmente se clasifica como transparente, opalescente y turbia. La única excepción es el caballo cuya orina normal es espesa y turbia debido a la presencia de moco y cristales.

OLOR: Carece de significado diagnóstico, a excepción de cuando hay cuerpos cetónicos que se percibe un olor a dulzón. (58)

Método

- 1.- Con la pipeta Pasteur, tomar una pequeña cantidad de orina y colocarla en un tubo de ensaye.
- 2.- Observar la muestra contra un fondo blanco y buena iluminación.
- 3.- Registrar el volumen, color, transparencia y olor de la orina. (19,21)

3.3.- EXAMEN QUÍMICO

El pH es normal en animales carnívoros pero se puede apreciar también en casos como acidosis metabólica y respiratoria, diabetes mellitas, etc.

El pH alcalino es normal en animales herbívoros y en casos patológicos como cistitis, dependiendo del tipo de bacteria, retención de orina, alcalosis tanto metabólica como respiratoria.

PROTEÍNAS: La presencia de proteínas en la orina siempre se considera patológica, excepto en el momento del parto, los primeros días de vida, después de ejercicio extenuante o durante el estro.

GLUCOSA: La orina normal no contiene glucosa. La glucosuria siempre es anormal.

CUERPOS CETÓNICOS: Se incluye el ácido acetoacético, acetona y ácido β -hidroxybutírico. Cuando aparece en la orina existe cetonemia concomitante.

DENSIDAD: Se mide la proporción de sólidos en solución e indica el grado de resorción tubular y la capacidad del riñón para concentrar la orina. Se puede ver afectada por diferentes causas ya sean fisiológicas o patológicas.

SANGRE: La orina puede contener sangre completa (hematuria) o hemoglobina sin eritrocitos (hemoglobinuria). La hemoglobinuria significa enfermedad general, mientras que la hematuria es más frecuente en aparato genitourinario. (58)

Método

- 1.- Colocar aproximadamente 5 ml de orina en un tubo de ensaye, con ayuda de la pipeta Pasteur.
- 2.- Sumergir la tira reactiva en el tubo de ensaye con la muestra de orina, durante unos segundos.
- 3.- Remover el exceso de orina tocando la tira reactiva con la pared del recipiente.
- 4.- Esperar el tiempo específico para cada reacción.
- 5.- Comparar el color de las zonas de reacción en la tira con el esquema de colores proporcionado por el fabricante de la tira, utilizando buena iluminación. Puede utilizar un lector automático de tiras reactivas.
- 6.- Interpretar los resultados. (19)

NOTA: En esta parte del estudio se describe la presencia de:

- Presencia de bilirrubina en orina
- Presencia de glucosa en orina
- Hemoglobina en orina
- Cetonas en orina
- Nitritos en orina
- Medición del pH
- Proteínas en orina
- Densidad de la orina
- Urobilinógeno en orina (28)

3.4.- EXAMEN MICROSCÓPICO

La orina normal por lo general contiene poco sedimento. Pueden encontrarse algunos leucocitos, células epiteliales, moco, cristales y bacterias en cantidades insignificantes, cuando no se ha recolectado la orina con técnica aséptica. (58)

Método

- 1.- Coloque el tubo de ensaye con la muestra de orina en una centrífuga.
- 2.- Centrifugar la muestra a 2000-3000 r.p.m durante 5 minutos.
- 3.- Decante con suavidad el sobrenadante para evitar perturbar el sedimento.
- 4.- Deje en el tubo 1.0 ml de orina.
- 5.- Mezclar con suavidad el sedimento para evitar el daño celular.
- 6.- Coloque una gota del sedimento en un portaobjetos y encima coloque el cubreobjetos.
- 7.- Observe en el microscopio con objetivo de 10x y 40x.
- 8.- Registre sus resultados. (1, 2,19, 21)

NOTA: En esta parte se estudian y dan resultados de:

- Presencia de bacterias u otros microorganismos.
- Cristales.
- Grasas.
- Mucosidad.
- Hematíes.
- Células tubulares renales.
- Células epiteliales.
- Leucocitos en orina. (28)

3.5.- REPORTE DE UN EXAMEN GENERAL DE ORINA

Especie: _____ Raza: _____ Edad: _____ Sexo: _____

Propietario: _____ Tel: _____

Clínico: _____ Tel: _____

Dx Tentativo: _____

EXAMEN FÍSICO

Volumen _____

Color _____

Aspecto _____

Olor _____

EXAMEN MICROSCOPICO

(Sedimento Urinario)

Cél. Epiteliales _____

Renales _____

Cristales _____

Eritrocitos _____

Leucocitos _____

Cilindros _____

Otros _____

EXAMEN QUÍMICO

pH _____

Proteínas _____

Glucosa _____

Acetona _____

Hemoglobina _____

Bilirrubina _____

Densidad _____

Urobilinógeno _____

Nitritos _____

Sangre _____

Comentarios _____

Patólogo Clínico.

IV. PARASITOLOGÍA

4.1.- Introducción

Las parasitosis intestinales pueden sospecharse por la presencia de sintomatología y datos epidemiológicos, pero la única forma de confirmar el diagnóstico es la demostración del parásito en cualquiera de sus formas evolutivas: diagnóstico parasitológico. El diagnóstico parasitológico se fundamenta en el conocimiento de la biología del parásito: hábitat, ciclo evolutivo, lo que permite tomar la muestra biológica y la técnica de laboratorio adecuada. El examen parasitológico de las heces: coproparasitología, tiene como objetivo diagnosticar los parásitos intestinales. Se han descrito muchas técnicas de examen de heces, algunas de ellas son de utilidad general, mientras que otras sólo sirven en casos muy concretos, de modo que se elige la más adecuada para un determinado tipo de muestra o para la detección de un determinado parásito. La consistencia de una muestra de heces es de gran importancia, indicando el tipo de organismo que puede contener. (6, 29, 38)

La efectividad de la técnica elegida depende de varios factores: sensibilidad, especificidad, calidad de los equipos y reactivos utilizados, adecuada ejecución y experiencia del operador. (12, 34)

4.2.- EXAMEN DE HECES

4.2.1.- Consejos para la obtención, manejo, almacenamiento y transporte de la muestra.

Obtención de muestra.

- ♦ Las muestras deben de ser lo más reciente posible, debido a la rápida eclosión de los huevesillos luego de la defecación.

- ♦ El propietario o quien recolecte la muestra, debe ver que el animal defecó esa muestra para asegurar que sea reciente y observar problemas como esfuerzo, presencia de sangre no modificada u otros.
- ♦ Las muestras recientes que no vayan a examinarse en un lapso de 2 horas refrigerarse durante 24 horas.
- ♦ Adulto, o sea un mínimo de 10 gr. (25,30)

Manejo de muestra.

- ♦ Las muestras se manejan con cuidado para evitar la contaminación humana.
- ♦ Se mantiene limpio el ambiente en las pruebas de laboratorio.
- ♦ Se llevan registros claros a medida que se realiza el procedimiento. (18, 23)

Almacenamiento

- ♦ Las muestras fecales pueden almacenarse en bolsas especiales, bolsas para sándwiches, recipientes de plástico o guantes de laboratorio invertidos de fuera adentro.
- ♦ Las muestras pueden almacenarse por tiempo indefinido en formalina al 10% (1 parte de heces por 9 de formalina.) con limitaciones menores.
- ♦ No debe usarse congelación, alcohol etílico al 70% o alcohol métilico al 100%. (3, 7)

Transporte

- ♦ Muestra debe enfriarse a 4° C en el refrigerador y luego empacarse en hielo o compresas frías por 24-48 horas.
- ♦ Si al envío se le anexan documentos importantes, se les debe colocar en una bolsa de plástico separa en previsión de derrames. (8,12)

La colecta y conservación de la muestra fecal es de vital importancia para determinar la calidad del examen. Deben usarse heces frescas, si la observación no es inmediata, refrigerar la muestra. (21)

La colecta debe ser en envase especial, sin orina o contaminación con tierra, la misma debe ser bien identificada. Se recomienda repetir la muestra en caso de resultados negativos. Es recomendable hacer un método general y otro específico. (23)

4.2.2.-Examen macroscópico

Consiste en la observación sobre las características de las heces: consistencia, color, presencia de moco, sangre y presencia de helmintos adultos y proglótidos. (39)

4.2.3.-Examen microscópico

Permite la visualización de huevos o larvas de helmintos, quistes, trofozoitos u oocistos de protozoarios. Puede ser cualitativo o cuantitativo. (27)

4.2.3.1.- Métodos cuantitativos: Son aquellos en los cuales se hace el conteo de los huevos en las heces, permitiéndolo así valorar la intensidad del parasitismo. Son de poco uso, los más utilizados son Stool-Hausser y Kato-Katz. (40, 41)

4.2.3.2.- Métodos cualitativos: Son los más utilizados, demostrando la presencia del helminto sin cuantificarla. Muchas veces es necesario concentrar la muestra debido a la escasez de parásitos. (23)

4.3.- EXAMEN COPROPARASITOSCOPICO EN FRESCO (CPS)

Objetivo

Diferenciar los parásitos (formas biológicas) presentes en un examen directo, de formas no biológicas (artefactos).

Introducción

Un examen coproparasitológico es el estudio de material fecal, para la búsqueda e identificación de formas parasitarias intestinales. Puede ser cualitativo o cuantitativo.

Los exámenes directos de heces son la forma más rápida de hacer diagnóstico de parasitosis. (8, 20)

Fundamento

Con estas técnicas podemos observar trofozoitos o quistes de protozoarios, lo mismo que larvas o huevos de helmintos, sin embargo, las diferencias importantes entre los tipos de muestra establecen los diferentes resultados. Una muestra líquida diarreica o una muestra de moco en exudado vaginal nos pueden mostrar trofozoitos, en cambio una muestra de materia fecal formada mostrará quistes. (4, 15, 23)

Material

- Aplicador de madera.
- Muestra de heces.
- 2 Portaobjetos.
- 3 Cubreobjetos.
- Microscopio.
- Guantes de látex.

Reactivos

- Solución salina fisiológica.
- Solución de yodo (Lugol o Aceite de Inmersión)

Métodos

1.- Con un aplicador de madera se toma una pequeña cantidad de materia fecal y se coloca en el centro de un portaobjetos limpio, enseguida se le adiciona una gota de solución salina fisiológica y con el mismo aplicador se hace una mezcla lo más homogénea posible.

2.- Hecha la mezcla, procurando que no hayan restos muy gruesos, se coloca un cubreobjetos sobre ella, cuidando que no queden burbujas y de ser necesario, se adiciona más reactivo por un lado del cubreobjetos para no dejar secar la preparación. Se puede sellar con barniz de uñas alrededor del cubreobjetos, para evitar que se seque y prolongar el tiempo para la observación.

3.- Se observa al microscopio a 10 X y después a 40 X. Con ayuda de un atlas de Parasitología, se aprende a diferenciar a los parásitos de los diferentes tipos de residuos fecales (artefactos).

4.- En otro portaobjetos se procede de la misma manera que los puntos 1 a 3, substituyendo la solución salina por Sol de yodo (Lugol). Los parásitos y sus estructuras se tiñen de amarillo o de café.

5.- Se observa al microscopio a 40X y a 100X y se anotan los resultados. (43, 47, 50)

4.4.- EXAMEN COPROPARASITOSCOPICO CONCENTRACIÓN POR SEDIMENTACIÓN (Método de Ritchie o Método del Formol-éter).

Objetivo

Desarrollo y comprensión de la técnica para aprender a concentrar e identificar parásitos intestinales en heces.

Introducción

La sedimentación de parásitos intestinales en heces se logra por centrifugación ligera o por gravedad del material fecal, conduciendo a la recuperación de todos los protozoarios, huevos y larvas, especialmente huevos de tremátodos. Concentra bien estas formas y elimina bastantes detritus orgánicos. Aunque se inactivan las formas móviles de los protozoarios, se mantiene la integridad de los organismos. Es efectivo aún en heces con cantidades excesivas de grasas y pueden observarse la mayoría de los quistes de protozoarios, así como huevecillos y larvas de helmintos, incluyendo los huevos con opérculo y tiene una eficacia moderada para los huevos de Esquistosoma. (2, 14, 20)

La técnica es útil para examinar heces que contienen sustancias grasas que interfieren en los métodos de flotación. (5)

Material

- Vaso de precipitado.
- Abatelenguas.
- Aplicador de madera.
- Muestra de heces.
- Tubo de ensaye o para centrífuga de 14 ml.
- Colador o malla.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.

- Centrífuga.
- Pipeta Pasteur.
- Microscopio.
- Guantes de látex.
- Gradilla.

Reactivos

- Sol. Salina fisiológica.
- Formol al 10%
- Éter
- Lugol

Método del Formol-éter (Método de Ritchie)

- 1.- Coloque en un vasito 1 g de heces (aprox. el tamaño de un cacahuate) mediante la ayuda con un abatelenguas y adicione 10-12 ml de solución salina fisiológica. Mezcle con un aplicador de madera y homogenice.
- 2.- Filtre la suspensión a través de un colador o malla y reciba el filtrado en un tubo de centrifuga de vidrio de 14 ml.
- 3.- Centrifugue 1 minuto a 1500 r.p.m. Elimine el sobrenadante y resuspenda en solución salina.
- 4.- Repita el paso anterior, dos o tres veces para lavar, resuspendiendo el sedimento en solución salina y homogenizando con un aplicador, para obtener un sedimento más limpio.
- 5.- Agregue al sedimento 10 ml de formol al 10% en solución salina, mezcle y deje en reposo durante 5 min.

6.- Añada 3 ml de éter y agite vigorosamente 30 segundos.

7.- Centrifugue 1 min. a 1500 r.p.m.

8.- Después de centrifugar, se observan 4 capas en orden descendente las cuales son:

- 1) éter y lípidos en la superficie
- 2) un tapón de restos fecales
- 3) formaldehído
- 4) sedimento en el fondo del tubo conteniendo los parásitos.

9.- Se decanta la muestra y se conserva el sedimento. Se le adicionan unas gotitas de lugol y se homogeniza. Se toma una gotita con una pipeta Pasteur y se monta entre porta y cubre. Se observa a 10 y a 40 X.

10.- Fuentes comunes de error: Una suspensión fecal demasiado cargada, suspensión fecal pobre, centrífuga mal equilibrada, tiempo y velocidad de centrifugación inadecuados. (50, 53, 55)

4.5.- EXAMEN CPS TÉCNICA CONCENTRACIÓN POR SEDIMENTACIÓN PARA MUESTRAS FRESCAS (Método de éter-formalina).

Objetivo

Diferenciar los parásitos (formas biológicas) presentes en un examen directo, de formas no biológicas (artefactos).

Introducción

La técnica de sedimentación concentra los parásitos presentes en la muestra fecal. La técnica incluye tamizar primeramente las heces para separar los residuos grandes, tratar con formol para matar y preservar los organismos, y adicionar un solvente como éter o acetato de etilo para disolver las grasas. Sin embargo, durante la sedimentación, aparte de concentrarse los parásitos, se quedan reunidos también algunos otros materiales, abundando los artefactos durante la observación. Debido a que se usan varios reactivos resulta antieconómico, no obstante su eficacia. (18, 46)

Material

- Tubo de ensaye o para centrífuga de 15 ml.
- Muestra de heces.
- Guantes de látex.
- Aplicador de madera.
- Centrífuga.
- Gasa.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Embudo.
- Tapón para tubo.
- Gradilla.

Reactivos

- Sol. Salina fisiológica.
- Sol. Yoda (Lugol).
- Éter o acetato de etilo.
- Formalina al 10%.

Métodos

1.- En un tubo de centrifuga, desmenuce una porción de heces de unos 2 cm. de diámetro en suero fisiológico para conseguir que 10 ml, de suspensión contenga cerca de 1 ml del sedimento centrifugado.

2.- Colar 10 ml de suspensión a través de dos capas de gasa en un embudo. Recolecte en tubo de centrifuga de 15 ml.

3.- Centrifugue durante 1 a 2 min. a 1,500 r.p.m o 600g.

4.- Decante el sobrenadante. El sedimento ocupará entre 1 a 1,5 ml de sedimento. Si la cantidad es mayor o menor ajuste a la cantidad adecuada. Si el sedimento es mayor resuspender en solución salina y eliminar la cantidad necesaria. Si es menor añada una segunda porción tratada de la misma manera que la primera.

5.- Resuspenda el sedimento en sol. Salina, centrifúguese y vuélvase a decantar.

6.- Añadir 9 ml de formalina al 10%, mezclar bien y dejar reposar por 5 min. o más.

7.- Añadir 3.0 ml de éter o acetato de etilo. Cierre el tubo con tapón y agite vigorosamente en posición invertida por lo menos 30 seg. Retirar el tapón con cuidado.

8.- Centrifugue por 1 minuto a 450 - 500 g.

9.- Retire el tubo y observe la formación de 4 capas como sigue:

- Capa de Éter.
- Tapón de restos fecales.
- Sol. De Formalina
- Sedimento que contiene parásitos.

10.- Marcar cuidadosamente con un aplicador de madera un anillo alrededor de la capa de restos fecales para liberarlo de los lados del tubo, volcar el líquido sobrenadante en un recipiente. Arrastrar el sedimento, añadir una cantidad similar de colorante de Yodo (Lugol) y colocarlo sobre un portaobjetos. Agregar un cubreobjetos y observar.

11.- Fuentes comunes de error: Una suspensión fecal demasiado cargada, suspensión fecal pobre, centrífuga mal equilibrada, tiempo y velocidad de centrifugación inadecuados. (43, 45, 49)

4.6.- EXAMEN COPROPARASITOSCOPICO MÉTODO DE CONCENTRACIÓN POR FLOTACIÓN DE WILLIS.

Objetivo

Realizar la técnica de flotación de Willis, para observar e identificar los parásitos que se pueden identificar con la técnica antes mencionada, ya que no todas las especies de parásitos suelen flotar.

Introducción

Este método es de alta sensibilidad en el diagnóstico de huevos livianos de helmintos: *A. duodenale*, *N. americanus*, *A. lumbricoides*, *H. nana*. No indicado en la búsqueda de huevos pesados ni de larvas. (16)

Fundamento

Recomendado especialmente para la investigación de Geo-helminetos. Consiste en preparar el material fecal con Solución saturada de NaCl. Los Huevos de helmintos de peso específico menor que la solución saturada de NaCl tienden a subir y adherirse a una lámina colocada en contacto con la superficie del líquido. (40,47)

Material

- Vaso de precipitado.
- Muestra de heces.
- Aplicador de madera.
- Portaobjetos.
- Microscopio.
- Guantes de látex.

Reactivo

Solución saturada de NaCl.

Métodos

- 1.- Tomar 1 gr. aproximadamente de materia fecal.

- 2.- Colocar la muestra en un recipiente pequeño de boca ancha o la misma tapa de la caja para recolectar las heces y mezclar con la solución saturada de NaCl con la ayuda de un aplicador de madera.

- 3.- Trate de llenar completamente el recipiente con la solución, mezcle.

- 4.- Cúbralo con un portaobjeto limpio, de manera que el líquido haga contacto con la lámina. Si es necesario coloque más solución.

5.- Esperar 5-10 minutos.

6.- En ese lapso, los huevos de helmintos, cuyo peso específico es menor que el de la solución, flotarán y quedarán adheridos a la cara del porta objeto en contacto con la mezcla.

7. - Retirar el portaobjeto e invertirlo rápidamente para evitar pérdida de material.

8.- Examinar al microscopio inmediatamente.

9.- Reporte sus resultados. Discútalos con sus compañeros, ventajas y desventajas del método. (35, 40, 47)

4.7.- EXAMEN COPROPARASITOSCOPICO MÉTODO DE CONCENTRACIÓN-FLOTACIÓN DE FAUST.

Objetivo

Desarrollo y comprensión de la técnica para aprender a concentrar e identificar parásitos intestinales en heces.

Introducción

Método indicado para el diagnóstico de huevos livianos de helmintos (Necator, tricocéfalos, áscaris, H. nana). (23)

Fundamento

Este método se utiliza solución de Zn, cuya densidad específica es de 1.180 (33%), que conforma un medio de densidad más alta que la de los huevos: Necator 1.055, Tricocéfalo 1.150, Ascaris fértil 1.110 y facilita que los huevos livianos de estos helmintos, con menor peso específico que la solución, se concentren y floten. (14)

La concentración adecuada aconsejada es la que usa como reactivo una solución acuosa de sulfato cinc al 33% con una densidad al 1.180. El agua utilizada diluye y lava la materia fecal. El filtrado con gasa doblada evita que los detritos gruesos traspasen las paredes, la centrifugación enriquece en delgada película la superficie del líquido centrifugado con los huevos livianos de algunos helmintos. (34,56)

Material

- Muestra de heces.
- Gasa.
- Tubo de ensaye o para centrífuga.
- Gradilla.
- Embudo.
- Porta objetos.
- Cubreobjetos.
- Guantes de látex.
- Centrífuga.
- Microscopio.
- Pipeta Pasteur.

Reactivos

- Agua destilada.
- Lugol (Aceite de inmersión)
- Sulfato de Cinc al 33%. ($ZnSO_4$)

Método

- 1.- Mezclar bien una porción de materia fecal para preparar una superficie en 10 partes de agua destilada.
- 2.- Filtrar la suspensión a través de una gasa doblada en cuatro, sobre un tubo de centrifuga, ayudándose con un embudo pequeño.
- 3.- Centrifugar el filtrado a 2500 r.p.m por 1 min.
- 4.- Decantar el líquido sobrenadante y completar con agua hasta igualar la medida anterior, centrifugar nuevamente. Resuspender el sedimento.
- 5.- Repetir el procedimiento 2 veces hasta que el líquido sobrenadante esté listo.
- 6.- Decantar nuevamente el líquido sobrenadante reemplazándolo por igual cantidad de solución de sulfato de cinc al 33%. Mezclar bien la solución con el sedimento. Centrifugar durante 1 minuto a 1500 r.p.m.
- 7.- Tomar 3-4 gotas de las partículas que flotan en la superficie del líquido. Colocarlos en un portaobjeto y mezclarla con 1-2 gotas de lugol, colocar cubreobjeto.
- 8.- Examinar al microscopio y reportar sus resultados. (19, 27, 35)

4.8.- EXAMEN COPROPARASITOSCOPICO METODO DE KATO.

Objetivo

Desarrollar y aplicar esta técnica para la identificación de parásitos.

Material

- Papel celofán humedecible
- Frasco ámbar
- Portaobjetos.
- Aplicador de madera.
- Papel absorbente.
- Microscopio.

Reactivos

- Solución de Kato:
- Glicerina 500 ml
- H2O destilada 450 ml
- Verde de malaquita 3% 6 ml
- Completar hasta 1000 ml con H2O destilada.

Procedimiento

Se corta el papel celofán en pequeños rectángulos de 25X40mm. En un frasco ámbar se coloca la solución de Kato, se introducen los cortes de celofán. Se depositan por un tiempo mínimo de 24 horas antes de ser usados.

Método

- 1.- Colocar en portaobjeto 60-70 mg de heces (\pm grano de arroz).
- 2.- Tomar un trozo de papel celofán humedecido en solución de Kato escurrir en papel absorbente para quitar el exceso.
- 3.- Invertir la preparación sobre la superficie plana y hacerle presión con el dedo, hasta que la muestra se extienda a 20-25 mm que no salga de los bordes del papel.
- 4.- Secar y clarificar a temperatura ambiente 30-45 minutos ó con una lámpara de 50W a una distancia de 20-30 cm por 15 minutos.
- 5.- Examinar al microscopio y reportar sus resultados. (7, 10,38)

Ventajas del método:

- ♦ Permite el camuflaje de varios parásitos en una misma muestra.
- ♦ Puede ser aplicado con facilidad en el medio rural.
- ♦ Es de bajo costo.
- ♦ Facilitar el conteo de huevos de *S. mansoni* y de infecciones moderadas de algunos otros helmintos. (43,56)

Desventajas:

- ♦ Está contraindicado en muestras verdaderamente diarreicas.
- ♦ No es recomendable en el despistaje de larvas de *S. stercoralis*, se tornan invisibles debido a la clarificación que hace la glicerina. (32)

4.9.- KATO CUANTITATIVO

Objetivo

Cuantificar la intensidad parasitaria en 1 gr de heces ya que es similar a la Técnica de Kato.

Introducción

El recuento de huevos en heces está indicado fundamentalmente en anquilostomiasis, pero también pueden hacerse en ascariasis y tricuriasis.

El recuento de huevos de *Enterobius vermicularis*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia*, *Hymenolepis nana* o *diminuta* y de larvas de *Strongyloides stercoralis*, no permite evaluar el grado de parasitismo, porque estos helmintos no tienen la luz del intestino como sitio normal de ovipostura.

Fundamento

Es una técnica para cuantificar la intensidad parasitaria en 1 gr de heces y se procede semejantemente a la Técnica de Kato.

Material

- Balanza digital.
- Muestra de heces.
- Abatelenguas.
- Guantes de látex.

1.- Se pesa 50 mg de heces. Esto indica que la Técnica se fundamenta en diagnosticar la veinteava parte de ml (1gr), por lo tanto, para conocer la carga parasitaria de un gramo de heces de un paciente, bastaría solamente multiplicar la cantidad de huevos logrados en 50 mg por 20. (4, 7, 15)

4.10.- TINCIONES TEMPORALES

Objetivo

Que el alumno aprenda a realizar tinciones temporales para identificación diagnóstica de parásitos.

Material

- Aplicador de madera.
- Muestra de heces.
- Guantes de látex.
- Portaobjetos.

Reactivos

- Sol. Salina fisiológica.
- Colorante de azul de metileno (colorante de Nair)

Método

1.- Con un aplicador de madera se toma una pequeña cantidad de materia fecal y se coloca en el centro de un portaobjetos limpio, enseguida se le adiciona una gota de solución salina fisiológica y con el mismo aplicador se hace una mezcla lo más homogénea posible.

2.- Hecha la mezcla, procurar que no hayan restos muy gruesos.

3.- Se le agrega colorante de azul de metileno (colorante de Nair), observando a los parásitos de color azul. Dejar secar.

4.-Se observa al microscopio a 10 X y después a 40 X. Con ayuda de un atlas de Parasitología, se aprende a diferenciar a los parásitos de los diferentes tipos de residuos fecales (artefactos). (21, 22, 33)

NOTA:

En el caso de *E. histolytica*, se cuenta con técnicas inmunodiagnósticas comercialmente disponibles, como las de ELISA (inmunoensayo-enzimático) para detección de antígenos fecales, para el diagnóstico de la amibiasis intestinal. El organismo patógeno *E. histolytica* y el no-patógeno *Entamoeba dispar* son morfológicamente idénticos cuando se observan al microscopio. En dicha técnica se utilizan anticuerpos monoclonales que detectan la proteína de adherencia que es inhibida por la galactosa en el patógeno *E. histolytica*. El requisito para esta prueba es que las heces sean frescas sin conservadores. (30, 45, 52)

V. BACTERIOLOGÍA

5.1.- Introducción

Estas técnicas tienen como finalidad facilitar el estudio de las características morfológicas, tintoriales, de cultivo, patogénicas y los rasgos epidemiológicos de la mayor parte de los géneros bacterianos de interés veterinario.

Se destaca también la importancia en salud pública de algunos géneros bacterianos que provocan auténticas zoonosis, por lo que merecen especial atención. Así mismo, señala las muestras y los medios de cultivo que deberán seleccionarse para lograr su aislamiento y las pruebas bioquímicas que según el caso permitirán su completa identificación.

En el laboratorio de Patología Veterinaria, en el área de bacteriología, solo tiene la responsabilidad de realizar la identificación tentativa de las bacterias. Para obtener un diagnóstico definitivo, deben solicitarse pruebas adicionales a un laboratorio de referencias, el cual tiene acceso a más técnicas y equipos. (1, 5, 11)

5.2.- Obtención de la muestra

- ♦ Las muestras deben colectarse con técnica aséptica.
- ♦ Se toma una cantidad adecuada de las muestras, para permitir el examen completo.
- ♦ Las muestras deben obtenerse antes de iniciar la antibioticoterapia. (51, 52,56)

Las muestras pueden ser diversas, para su análisis. Los cuáles pueden ser:

- ♦ ABORTO: deben obtenerse el feto entero o múltiples muestras de diversas partes corporales en cuanto sea posibles luego de la muerte del animal.

- ♦ **ABSCESO O HERIDA:**
 - Intacto: jeringa estéril con aguja de gran calibre.
 - Sin integridad: aplicar la torunda cerca del borde de la herida y obtener raspaduras de la pared interna del absceso.
- ♦ **BACTERIAS ANAEROBIAS:** jeringa estéril con aguja de pequeño calibre.
- ♦ **Precaución:** expulsar todo el aire de la jeringa antes de obtener la muestra.
- ♦ **SANGRE:** 5-10 ml de sangre de al menos 2 sitios distintos, que se colocan de inmediato en frascos de cultivo sanguíneo separados. Se colectan varias muestras durante el transcurso del día.
- ♦ **OIDO:** frotis de ambos conductos auditivos y oídos medios de ser necesario.
- ♦ **OJO:** raspados corneales, frotis de las secreciones del saco conjuntival o secreciones lagrimales.
- ♦ **HECES:** 1gr de heces recientes o examen rectal con obtención de muestra. Precaución: limpiar el ano antes de la toma de muestra para evitar la contaminación por microflora de la piel perianal.
- ♦ **GENITALES:** frotis de la mucosa vulvar.
- ♦ **LEPTOSPIROSIS:** 20 ml de orina de la mitad del chorro.
- ♦ **ORINA:** 5 ml vía sonda o cistocentesis. (11, 14, 25, 30)

5.3.- Manejo

- ♦ Las muestras se manejan con cuidado para evitar la contaminación humana.
- ♦ Cuando se manejan muestras múltiples se separan para evitar contaminación cruzada.
- ♦ Mantener limpio el ambiente en que se realizan las pruebas de laboratorio.
- ♦ No deben usarse torundas de madera con punta de algodón para tomar muestras cuando se sospecha infección por clamidiosis.

- ♦ Las muestras deben almacenarse claramente con el nombre del paciente, número, origen de la muestra, hora de colecta e indicación si se refrigeró. (13, 20, 34)

5.4.- Almacenamiento

- ♦ Las muestras obtenidas por frotis deben colocarse en un medio adecuado para transportes si no se inoculan portaobjetos de inmediato con ellas.
- ♦ Las placas de agar deben de almacenarse invertidas, para evitar la acumulación de agua condensada en la superficie. (45, 49)

5.5.- Transporte

- ♦ Se aseguran con cinta las tapas y tapones de los tubos inoculados antes del embarque.
- ♦ El tejido que se envía para cultivo micótico debe congelarse y marcarse con la leyenda de "Precaución", debido a su potencial zoonótico.
- ♦ Desalojar el agua que se acumule en la tapa, para evitar que gotee en la placa de agar y mezcle las colonias de bacterias. (31, 35)

5.6.- INOCULACIÓN E INCUBACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS

5.6.1.- Puntos generales para una técnica adecuada.

- ♦ Mantener tapadas las cajas de Petri a menos que se estén inoculando o transfiriendo muestras.
- ♦ No colocar en la mesa el tapón del tubo con medio de cultivo para evitar contaminaciones.
- ♦ Flamear el cuello del tubo antes y después de transferir especímenes.
- ♦ Cuando se flamea el asa o el alambre de inoculación, colocar el extremo más cercano al mango en la parte más caliente de la flama (azul), y avanzar hacia el asa para prevenir salpicaduras.

- ♦ Cuando se transfiere la muestra al agar, usar con tacto suave para evitar romper la superficie. (22, 36, 43)

5.6.2.- Inoculación de placas.

- ♦ Dividir mentalmente la placa de agar en 4 cuadrantes.
- ♦ Flamear y dejar enfriar el asa de inoculación.
- ♦ Sumergir el asa en la muestra por cultivar.
- ♦ Rayar el espécimen en el cuadrante A.
- ♦ Repetir los pasos 2-4 por cada cuadrante, repasando ligeramente el cuadrante previo. Asegurarse de solo repasar el rayado del cuadrantes previo 1-2 veces, para evitar la concentración de cantidades excesivas de bacterias en una zona. Se espera que en el cuadrante D solo se formen colonias aisladas.
- ♦ Se retira el asa y se vuelve a flamear. (45, 49)

5.6.3.- Inoculación sesgada

- ♦ Flamear y dejar enfriar el asa de inoculación.
- ♦ Sumergir el asa en la muestra a cultivar.
- ♦ Tipos de inoculación sesgada:
 - a).- Sólo sesgada: se forma una “S” al tiempo que se perforan el medio de cultivo con la punta del alambre de inoculación.
 - b).- Sólo punción: se introduce el alambre en el agar y luego se retira lentamente por el mismo orificio.
- ♦ Se retira el asa y se vuelve a flamear. (18, 21, 30)

5.6.4.- Inoculación en caldo

- ♦ Flamear y dejar enfriar el asa de inoculación.
- ♦ Sumergir el asa en la muestra por cultivar.
- ♦ Insertar el asa o la punta del alambre en el caldo, inmediatamente debajo de la superficie y tocar la pared del tubo.
- ♦ Se retira el asa o la punta y se vuelve a flamear.

Nota: trabajar con 2 asas de inoculación; mientras se usa una la otra puede estar enfriándose. (3, 14, 48)

5.6.5.- Incubación de tubos.

- ♦ Mantener la incubación a 37° C de temperatura y 70% de humedad.
- ♦ Las palcas deben colocarse invertidas, para impedir el exceso de condensación en la superficie del agar.
- ♦ La tapa roscada de los tubos de cultivo debe dejarse floja durante la incubación.
- ♦ Los cultivos deben de incubarse por 48 horas y revisar a las 24 horas.
- ♦ Para incrementar la concentración de dióxido de carbono, colocar las placas invertidas en un recipiente de vidrio con una vela encima. Se enciende la vela y se coloca la tapa firmemente cerrada. Se deja que la vela se apague sola, lo que reduce la cantidad de oxígeno e incrementa el dióxido de carbono. Esto no crea un ambiente anaerobio. (1, 4, 39)

5.7.- EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE UN CULTIVO.

5.7.1.- Cambios del medio ambiente.

- ♦ Configuración hemolítica.
- ♦ Cambio de color.
- ♦ Olor. (3,5)

5.7.2.- Evaluación microscópica.

- ♦ Tinción simple.
- ♦ Tinción de Gram.
- ♦ Tinción para bacterias acidorresistentes.
- ♦ Tinción negativa. (12, 23)

5.7.3.- Pruebas de diferenciación

- ♦ Prueba de catalasa
- ♦ Prueba de oxidasa.
- ♦ Prueba de indol. (1, 4)

5.8.- TINCIÓN Y MÉTODOS SEMEJANTES

5.8.1.- Introducción

Las bacterias no teñidas muestran pocos detalles morfológicos; el diagnóstico bacteriológico se basa en las diferentes afinidades tintoriales de las bacterias para identificarlas más adecuadamente. Sin embargo, también resultan útiles las preparaciones no teñidas en la determinación de la movilidad y la llamada tinción negativa. (2, 6,18)

5.8.2.- PREPARACIONES HÚMEDAS

5.8.2.1.- MÉTODO DE LA GOTA PENDIENTE PARA INVESTIGAR LA MOTILIDAD

Objetivo

Desarrollar la técnica y observar la motilidad de las bacterias.

Material

- Muestra a emulsionar.
- Cubreobjetos.
- Portaobjetos.
- Microscopio.
- Guantes de látex.

Método

- 1.- Se coloca una emulsión de una colonia o una gota de (4-6 hrs.) cultivo líquido en un cubreobjetos.
- 2.- Se hace un pequeño anillo de plasticina sobre un portaobjetos.
- 3.- Se aproxima el porta al cubreobjetos de manera que la gota de líquido quede entre ambas superficies de vidrio y quede separada de la superficie del portaobjetos por el grosor de la plasticina.
- 4.- Se presiona suavemente para formar una cámara y se invierte rápidamente la preparación de manera que la gota penda del cubreobjetos en la cámara.
- 5.- Se examina a seco fuerte para observar la movilidad, asegurándose de no confundir el movimiento browniano con la verdadera movilidad, que es mostrada por las bacterias que se mueven en dirección opuesta y llegan a cruzarse; en el movimiento browniano las partículas o bacterias oscilan alrededor de la misma posición. (22, 36, 50)

5.8.2.2.- TINCIÓN NEGATIVA

Objetivo

Realizar la técnica y determinar la movilidad de las bacterias.

Material

- Porta objetos.
- Muestra a teñir.
- Microscopio.
- Guantes.

Reactivos

- Tinta china o nigrosina.

Método

Los microorganismos no teñidos son observados contra un fondo oscuro. Pueden mezclarse nigrosina o tinta china en cantidades iguales con suspensiones de cultivo sobre un portaobjetos y extender la mezcla en forma homogénea. El frotis es entonces secado y examinado al microscopio. Son fácilmente reconocibles los microorganismos con caracteres morfológicos típicos, como *Cryptococcus* y *Clostridium tetani*. (25, 29)

5.8.3.- PREPARACIONES FIJAS Y TEÑIDAS.

5.8.3.1.- Introducción

Son de uso casi universal, tanto a partir de especímenes recibidos como de colonias cultivadas. En general, una muestra del espécimen original puede ser colocada directamente sobre el portaobjetos o bien ser recogida con una asa, recordando siempre tener una preparación delgada y homogénea.

Una colonia puede ser examinada haciendo con ella una emulsión tenue en una gota de solución salina, y luego extendiéndola con una asa sobre un portaobjetos. Las películas secadas al aire son fijadas por calor suave sobre la flama de un mechero de Bunsen y luego pasadas a través de ella. Debe tenerse cuidado para evitar el calor excesivo, que puede alterar la forma bacteriana. El calor deseable es aquel en que el portaobjetos sea apenas demasiado caliente para ser colocado sobre el dorso de la mano. (1, 3)

5.8.3.2.- TINCIÓN DE AZUL DE METILENO (LOEFLER)

Objetivo

Realizar la técnica de tinción para identificar correctamente las bacterias.

Material

- Portaobjetos.
- Muestra a teñir.
- Puente de tinción.
- Guantes.
- Microscopio.

Reactivos

- Solución saturada de azul de metileno en alcohol 30ml.
- Solución de hidróxido de potasio (1 por 10000) en agua 100 ml.
- Agua.

Método

Se tiñe cubriendo la película durante tres minutos y luego se lava con agua. Con esto se colorean las estructuras en diversos tonos de azul; los objetos y microorganismos son diferenciados sobre bases exclusivamente morfológicas. (14, 23)

5.8.3.3.- TINCIÓN DE GRAM

Objetivo

Desarrollar y aprender la técnica de tinción ya que es la más usada.

Material

- Puente de tinción.
- Portaobjetos.
- Muestra a teñir.
- Guantes de látex.

Reactivos

- Cristal violeta al 0.5 por 100 en agua destilada.
- Solución yodada de Gram.
- Yodo 1 gr.
- Yoduro de potasio 2 gr.
- Agua destilada 300 ml.
- Alcohol etílico de 70 por 100.
- Carbolfucsina diluida.
- Carbolfucsina de Ziehl-Neelsen un volumen.
- Agua destilada 9 volúmenes.

Método

- 1.- Se prepara y se fija un frotis en la forma descrita anteriormente.
- 2.- Se tiñe con cristal violeta durante 1 minuto y luego se lava con yodo.
- 3.- Se aplica como mordente yodo durante un minuto más.
- 4.- Se decolora con alcohol hasta que ya no escurra líquido azul.
- 5.- Se lava con agua.
- 6.- Se vuelve a teñir con carbolfucsina diluida durante un minuto.
- 7.- Se lava con agua y se seca. (21, 54, 57)

5.8.3.4.- TINCIÓN DE ZIEHL-NEELEN

Objetivo

Realizar la técnica y llevarla a cabo cuando sea necesaria su identificación.

Material

- Portaobjetos.
- Muestra a teñir.
- Puente de tinción.
- Guantes de látex.
- Mechero.

Reactivos

- Fucsina básica pulverizada 5gr.
- Fenol 25 gr.
- Alcohol de 95 por 100 50 ml.
- Agua destilada 500 ml.
- Azul de metileno.
- Acido sulfúrico.

Se disuelve la fucsina en fenol con un poco de agua en baño de agua hirviendo; se añade el alcohol y se mezcla; se añade el resto del agua y se filtra antes de usarse.

Método

- 1.- Se cubre el portaobjetos con solución de carbolfucsina y se calienta hasta emisión de vapores. Se tiñe durante 20 o 30 minutos. No se deja evaporar.
- 2.- Se lava con agua.

3.- Se lava con ácido sulfúrico al 20 por 100, hasta que la película sea amarilla, y luego se lava con agua. Devolverse rosada se repite el procedimiento hasta que permanezca amarilla al ser lavada.

4.- Se lava bien con agua.

5.- Se trata con alcohol de 95 por 100 por 2 minutos.

6.- Se lava.

7.- Se hace la tinción de contraste con azul de metileno (loefler) durante 30 segundos.

8.- Se lava y se seca. (2, 15, 43)

5.8.3.5.- TINCIÓN DE KINYOUN

Objetivo

Realizar y ponerla en práctica ya que es similar a la de Zielhl-Neelsen.

Material

- Muestra a teñir.
- Puente de tinción.
- Guantes de látex.
- Portaobjetos.

Reactivos

- Fucsina básica 4gr.
- Fenol 8gr.
- Alcohol etílico de 95 por 100 20 ml.
- Agua destilada 100 ml.

Se prepara como para cabolfucsina de Ziehl-Neelsen.

Método

- 1.- Se cubre el portaobjetos con colorante por 30 minutos a la temperatura del laboratorio.
- 2.- Se deja escurrir y se decolora con alcohol ácido al 1 por 100 durante 30 minutos por lo menos. La decoloración debe de ser continuada por la noche si conviene y no produce efectos nocivos.
- 3.- Se lava con agua.
- 4.- Se hace la tinción de contraste con azul de metileno. (12, 27, 50, 56)

5.8.4.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS (Enterobacterias)

A partir de una sola colonia aislada, se siembra en tubos de medio MIO (movilidad, indol y ornitina), TSI (agar triple azúcar y hierro) y LIA (agar lisina y hierro). Se trata de tres medios diferenciales que permiten observar simultáneamente dos o mas fenómenos.

Los tubos se siembran como se indicará mas adelante, se incubaran a 24 horas a 37° C y se leen los resultados. La interpretación de estos resultados para la identificación bacterina se hacen de acuerdo como se muestra en el cuadro 4.8.4.1.

Cuadro 1
Reacciones de las enterobacterias en medios LIA, TSI y MIO

GENERO Y ESPECIE	AGAR LIA			H ₂ S	AGAR TSI			MEDIO MIO		
	SUP	PICADURA	GAS		FONDO	GAS	H ₂ S	MOV	INDOL	ORN
<i>Escherichia</i>	K	K o N*	- o +	-	A	A	+	+	- o +	- o +
<i>Shigella</i>	K	A	-	-	K	A	-	-	- o +	- o +
<i>Salmonella</i> , biovar typhi	K	K	-	+ o -	K	A	-	+	-	-
<i>Salmonella</i> , biovar paratyphi A	K	A	+ o -	- o +	K	A	+	+	-	-
<i>Salmonella</i> , subsp 3a y 3b	K	K o N	+ o -	+ (-)	K(A)	A	+	+	-	+
Grupo Arizona	K	K o N	+ o -	+ (-)	K	A	+	+	- (+)	+
<i>Citrobacter freundii</i>	K	A	- o +	+ o -	K(A)	A	+	+	-	- o +
<i>Citrobacter diversus</i>	K	A	- o +	-	K(A)	A	+	+	-	+
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	K	A	- o +	-	K(A)	A	+	+	-	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	K	K	- o +	+	K	A	+	+	-	-
<i>Klebsiella</i>	K o N	K o N	+ o -	-	A	A	+	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	K o N	A	+ o -	-	A	A	+	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	K	K o N	+ (-)	-	K	A	+	+	-	+
<i>Hafnia alvei</i>	K	K o N	- o +	-
<i>Serratia marcescens</i>	K o N	K o N	-	-	K o A	A	-	+	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	R	A	-	- (+)	A(K)	A	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	R	A	-	- (+)	K(A)	A	+	+	+	+
<i>Morganella morganii</i>	K o R	A	-	-	K	A	- (+)	+	+	+
<i>Providencia</i>	R	A	-	-	K	A	+ o -	+	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	A	A	-	-	A	A	-	+	+	+

K: alcalino
K: alcalino
A: ácido
N: neutro
R: rojo (desaminación oxidativa)
(+): ocasionalmente positivo
(-): ocasionalmente negativo

*Una reacción alcalina o neutra en la picadura indica descarboxilación
** Algunas cepas producen ác. sulfhídrico por la presencia e u plásmido
*** *Shigella sonnei* es ornitina positivo

Tomado de EWING, 1986

BAC-22

Cuadro 5.8.4.1.- Reacciones de las enterobacterias en medios LIA, TSI Y MIO

5.8.4.1.- Medio MIO (movilidad, indol y ornitina)

1.- Es un medio semisólido que contiene ornitina y un indicador de pH y se usa para determinar la movilidad de bacteria, su capacidad de descarboxilar la ornitina y la de producir indol. Se siembra por picadura y se incuba 24 horas a 37° C.

- ♦ Indicador de pH: púrpura de bromocresol.
- ♦ pH ácido: vire a color amarillo.
- ♦ pH alcalino: vire a color púrpura o morado.

2.- La movilidad se determina:

- ♦ Movilidad negativa: el crecimiento es sólo a lo largo de la picadura.
- ♦ Movilidad positiva: medio turbio, crecimiento en todo el medio.

3.- La descarboxilación de la ornitina se efectúa en anaerobiosis y por eso la prueba se lee en el fondo del tubo.

- ♦ Ornitina positiva: el fondo del tubo debe alcalinizarse y presentar color púrpura o morado.
- ♦ Ornitina negativa: fondo del tubo amarillo.

4.- El indol es un producto final del triptófano y se pone de manifiesto agregando 5 gotas de reactivo de Ehrlich o de Kovac al medio.

- ♦ Indol positivo: formación de anillo de color rojo en la superficie.
- ♦ Indol negativo: formación de un anillo de color amarillo en la superficie.

5.8.4.2.- Agar TSI (agar de hierro y triple azúcar)

1.- Determina la fermentación de la glucosa, sacarosa y lactosa, la producción de gas a partir de glucosa y de ácido sulfhídrico que precipita como sulfato férrico al reaccionar con el hierro.

- ♦ Indicador de pH: rojo de fenol.
- ♦ pH ácido: color amarillo.
- ♦ pH alcalino: color rojo.

2.- La fermentación de la glucosa se efectúa en anaerobiosis, por la cual la prueba se lee en el fondo del tubo.

- ♦ Glucosa positiva: fondo amarillo.
- ♦ Glucosa negativa: fondo sin cambio.

3.- La fermentación de la sacarosa y/o lactosa es aerobia, razón por la cual se lee en la superficie del medio.

- ♦ Sacarosa y lactosa positiva: superficie amarilla.
- ♦ Sacarosa y lactosa negativa: superficie roja.

4.- Cuando la fermentación da lugar a la formación de bióxido de carbono, éste puede ser observado.

- ♦ Producción de gas: burbujas de gas en el medio.

5.- En el agar TSI también se determina la producción de ácido sulfhídrico

- ♦ Producción de H₂S: precipitado de negro en el fondo o en el sitio de la picadura.

5.8.4.3.- Agar LIA (agar hierro y lisina)

1.- Contiene, una sal de hierro y un indicador de pH. Determina la descarboxilación de la lisina que se lleva a cabo en anaerobiosis y la desaminación de la lisina que es en aerobios.

- ♦ Indicador de pH: púrpura de bromocresol.
- ♦ pH ácido: vire del indicador amarillo.
- ♦ pH alcalino: vire del indicador a púrpura.

2.- La descarboxilación de la lisina se observa:

- ♦ Descarboxilación positiva: fondo del tubo púrpura, alcalinización.
- ♦ Descarboxilación negativa: fondo del tubo amarillo.

3.- La desaminación de la lisina se observa:

- ♦ Desaminación positiva: superficie del tubo rojo vino.
- ♦ Desaminación negativa: superficie del tubo sin cambio.

4.- También se determina aquí la formación de gas a partir de glucosa y la producción de ácido sulfhídrico.

- ♦ Producción de gas: burbujas de gas en el medio.
- ♦ Producción de H₂S: precipitado negro en el fondo o en el sitio de la picadura.

La identificación de las enterobacterias se continúa con la realización de la prueba de oxidasa, la cual se hace con el crecimiento en el tubo LIA. Todas las enterobacterias dan prueba negativa.

5.8.4.4.- Prueba de oxidasa

1.- Se realiza con bacterias en fase lag (18 a 24 hrs.) desarrolladas en un medio que no contenga azúcar.

2.- Se coloca un pedazo de papel filtro en una caja Petri y se ponen 2 a 3 gotas del reactivo de oxidasa (N,N,N,N tetrametil parafenilén diamina)

3.- Se tomo un inóculo bacteriano pequeño con una asa de platino (no de nicromo) o con un palillo o aplicador de madera estéril y se esparce bien sobre el papel filtro impregnado con el reactivo.

4.- Se esperan 10 segundos y se busca la aparición de una mancha de color púrpura obscuro.

5.- Como testigos pueden usarse una cepa de *Pseudomonas* (positvas) y una de *E. coli* (negativa).

6.- Opcionalmente la prueba puede realizarse con papeles filtro ya preparados que se pueden obtener en comercios.

Con los resultados de la prueba de oxidasa (en primer lugar, para descartar los exámenes siguientes si el aislamiento no corresponde a una enterobacteria) y de las pruebas fisiológicas en los medios MIO, TSI y LIA (en segundo lugar), se puede llegar a la identificación definitiva o tentativa del género y especie de la enterobacteria aislada.

Dependiendo del agente aislado, puede ser necesario recurrir a otros métodos que determinen diversas capacidades fisiológicas y así concluir la especie a la que pertenezca.

Los métodos y procedimientos se describen a continuación:

5.8.4.5.- Indol (producción de indol)

Ver el procedimiento en la descripción del medio MIO:

5.8.4.6.- Rojo de metilo (Prueba del rojo de metilo)

Se usa para demostrar los ácidos estables por la fermentación de la glucosa.

1.- Se siembra un tubo de caldo RM/VP con un inóculo grueso y se incuba a 37° C durante 48 horas.

2.- Se adicionan al tubo 5 gotas de la solución de rojo de metilo y se lee de inmediato.

- ♦ Positiva: el reactivo queda de color rojo (pH 4.4).
- ♦ Negativa: el reactivo adquiere color amarillo.
- ♦ Dudosa: el reactivo toma un color anaranjado. Se debe incubar 4 días más y repetir la prueba.

5.8.4.7.- Voges-Proskauer (prueba de Voges-Proskauer)

Se emplea para demostrar la producción de acetil metil carbinol (acetoína) por la fermentación de la glucosa.

1.- Se siembra en un tubo de caldo RM/VP un inóculo grueso y se incuba a 37° C durante 24-48 horas.

2.- Se adiciona al medio 0.5 ml de alfa-naftol y tres gotas de hidróxido de potasio al 40% y se lee a los 15 minutos.

- ♦ Positiva: aparece un anillo de color rojo en la superficie.
- ♦ Negativa: el anillo queda incoloro o de color café.

5.8.4.8.- Citrato (utilización de citrato)

Se busca si la bacteria es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono.

1.- Se siembra un inóculo ligero en un tubo inclinado con agar citrato de Simmons (por estria) o con agar citrato de Christensen (por estría y picadura) y se incuba a 37° C durante 18-24 horas.

- ♦ Positiva: reacción alcalina:
 - El agar de Simmons toma color azul Prusia.
 - El agar de Christensen toma color rojo violeta.

- ♦ Negativa: no hay crecimiento:
 - El agar de Simmons permanece verde.
 - El agar de Christensen permanece amarillento.

5.8.4.9.- H₂S (Producción de ácido silfídrico)

Ver el procedimiento en las descripciones de los medios TSI y LIA.

LITERATURA CITADA

- 1.- Diana Nicoll, Stepehn McPhee, Michael Pignone (2004). Manual de pruebas de Diagnostico. 4ª Edición. Editorial Manual Moderno.
- 2.- Candyce M. Jack, Patricia M. Watson, Marks Donovan (2005). 1ª Edición. Editorial McGraw- Hill.
- 3.- Maxine M. Benjamín (1991). Manual de Patología Clínica en Veterinaria. 3ª Edición. Editorial Limusa Noriega Editores.
- 4.- Dr. Roberto Jiménez. Alteraciones No Patologicas En Hematologia Veterinaria. URL disponible en:
<http://vetarg.50megs.com/MODULO5/MEDICINAV/hematologia%20no%20patologicas.pdf>
- 5.- Helmut Kraft. Pieter Schillinger (1998). Métodos de Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria de Mamíferos Domésticos .3ª Edición. Editorial Acribia.
- 6.- T. Sáez, A. Loste, M.C. Marca (2002). Hemograma en el perro: comparación de los resultados manuales y semiautomáticos. Med. Vet.; vol. 19 (6): 91-95. URL disponible en:
<http://www.pulso.com/medvet/Protegido/numero6-2/pdf/hemograma.pdf>
- 7.- A. J. Carrillo-Muñoz, C. Tur-Tur. Técnica micológica para muestras dermatológicas Dep. Microbiología. ACIA. Barcelona. URL disponible en:
<http://www.actualidaddermatol.com/art41096.pdf>.

8.- Torres-García ME, Vargas-Morales JM, Díaz-Ruiz MGY (2007). Estudio comparativo entre equipos de Química Clínica y Hematología a partir de la evaluación retrospectiva del control de calidad interno: URL disponible en:

<http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2007/bqs071r.pdf>.

9.- Isaac Túnez Fiñana, María del Carmen Muñoz, Pedro Montilla López. Centrifugación estudio del Hemetocrito Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 –Córdoba. URL disponible en:

<http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/09%20CENTRIFUGACI%C3%93N.pdf>.

10.- Biometría Hemática. URL disponible en:

<http://pdf.rincondelvago.com/biometria-hematica.html>

11.- Rafael Molina López. Centro de Fauna de Torreferrussa. Hematología Y Bioquímica Sanguínea. URL disponible en:

http://encontroiberico.no.sapo.pt/docs/Hematologia_RMolina.pdf

12.- Merck KGaA, Darmstadt (2004). Reactivo de Hayem para microscopia. URL disponible en:

<http://www.merck.de/servlet/PB/show/1239600/109260es.pdf>

13.- Merck KGaA, Darmstadt (2004). Número de trombocitos para microscopia. URL disponible en:

<http://www.merck.de/servlet/PB/show/1239850/113795es.pdf>

14.- Recuento de Leucocitos. URL disponible en:

<http://pdf.rincondelvago.com/recuento-de-leucocitos.html>

15.- Merck KGaA, Darmstadt (2004). Solución de Türk para microscopia. URL disponible en: <http://www.merck.de/servlet/PB/show/1239650/109277es.pdf>

16.- Sociedad De Bioquímicos De Santa Fe. Líquido Diluyente Para El Recuento De Plaquetas. URL disponible en: <http://www.cadime.com.ar/PLAQUETAS.PDF>

17.- Dra. Nilda E. Fink, Dra. María Elena Chiesa, Dra. Alejandra Fernández Alberti, Bioq. Fernando Ventimiglia, Bioq. Mariana González, Bioq. José Luís Casali (2005). Métodos Del Laboratorio Hematológico, Segunda Parte. Universidad nacional de la plata facultad de ciencias exactas. Departamento de ciencias biológicas. Cátedra de Análisis Clínicos (hepatología). URL disponible en: <http://www.biol.unlp.edu.ar/hematologia/guia2.doc>

18.- Manual de Hematología. URL disponible en: <http://pdf.rincondelvago.com/manual-de-hematologia.html>

19.- QFB. Javier Villarino Valdivi, Dra. Laura Valencia Espinoza, Dra. Sara Cortés Bargalló (2007). Manual de Laboratorio de Análisis Clínicos. Universidad Autónoma de Baja California Facultad de Medicina Psicología Manual de Análisis Clínicos. Código: L1M-N3-001. Numero de revisión 1. URL disponible en: <http://medicina.ens.uabc.mx/manlab/L1M-N3-001.pdf>

20.- John Bernard Henry, Lynch, Raphaell, Mellor, Spare, Inwood. Bacteriología II. 789 – 790. 146 –147. URL disponible en: <http://pdf.rincondelvago.com/preparacion-de-medios-de-cultivo.html>

21.- Dra. María del Carmen Laso (2002). Interpretación del análisis de orina. Arch.argent.pediatr; 100(2) / 179. URL disponible en: http://www.sap.org.ar/staticfiles/archivos/2002/arch02_2/179.pdf

22.- Recuento de Eritrocitos. URL disponible en:

http://www.ugr.es/~jhuertas/EvaluacionFisiologica/Recuento_rojos/redcell2.htm

23.- Parasitología. URL disponible en:

http://pdf.rincondelvago.com/parasitologia_9.html

24.- Murray, R.P., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenover (2003). Coproparásitoscopico Concentración Por Sedimentación. URL disponible en:

<http://www.uacj.mx/ICB/manuales/mparasi/P8-%20Copro%20Sediment.pdf>

25.- Coproparasitoscopico en Fresco y Tinciones Temporales. URL disponible en: <http://www.uacj.mx/ICB/manuales/mparasi/PRACTICA%20%206.pdf>

26.- Giovanni Pajuelo Camacho, Daniel Lujan Roca, Bertha Paredes Pérez, Raúl Tello Casanova (2006). Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales. Rev. Méx. Patol. Clín, Vol. 53, Num. 2 pp 114-118. URL disponible en:

<http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2006/pt062g.pdf>

27.- M.J. Lynch, S.S. Raphael, L.D. Mellor, P.D. Spare, M.J.H. Inwood (1977). Métodos de Laboratorio Tomo 1. Editorial Interamericana.

28.- M.J. Lynch, S.S. Raphael, L.D. Mellor, P.D. Spare, M.J.H. Inwood (1977). Métodos de Laboratorio Tomo 2. Editorial Interamericana.

29. Atías, A. (1996). Parasitología Clínica; 3ª edición, Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda, Chile.

30.- Ash, L; Orihel, T. (1991). Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification; ASCP PRESS, Chicago, USA.

31.- García, L; Bruckner, D.(1993). Diagnostic Medical Parasitology; 3rd edition, American Society of Microbiology, Washington, USA.

32.- Larragán, M. (1993). Comparación de los principales métodos de diagnóstico para Enteroparásitos. Tesis de Bachiller en Medicina-U.P. Cayetano Heredia.

33.--Tello, R. (1998). Empleo de una nueva técnica parasitológica rápida de sedimentación espontánea en el diagnóstico de protozoarios y helmintos. V Jornadas Científicas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

34.- Lumbreras, H. Aplicación de la "Técnica de Baermann modificada en copa" en el diagnóstico y control terapéutico de la Balantidiosis. Rev. Med. Per. 1961;30:21-25.

35.- Tello, R. (1988). Examen de esputo empleando la Técnica de Baermann para el diagnóstico de Autoinfestación por *Strongyloides stercoralis*. Libro de resúmenes del Simposio Internacional "Parasitismo Intestinal en el hombre", Sociedad Peruana de Parasitología; Lima, Perú.

36.- Lumbreras, H; Cantella, R; Burga, R. Acerca de un procedimiento de sedimentación rápida para investigar huevos de *Fasciola hepatica* en las heces, su evaluación y uso en el campo. Rev. Med. Per. 1962;31:167-174.

37.- Terashima, A; Sánchez, E; Tello, R. et al. (1999). Diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* por cultivo en agar. Libro de resúmenes del XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología; Acapulco, México. FLAP,

38.- Terashima, A; Sánchez, E; Tello, R. et al. (1999). Empleo de la técnica de Dancescu para el diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*. Libro de resúmenes del XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología; Acapulco, México. FLAP.

- 39.- Lavin S, Mora FJ, Monreal L, Viñas L. Evaluation of a haematological analyzer for its use in canine clinical pathology. *J Vet Med (A)* 199; 38: 702-709.
- 40.- Marca MC. Gómez J et al (1992). Hematología en mamíferos. Manual Práctico de Análisis Clínicos en Veterinaria. Mira editores, S.A. Zaragoza, pp: 21-76.
- 41.- O'Sullivan MB. Quality control of multichannel hematology analyzers: critique of current methods and the need for performance goals. *Clin Lab Haemat* 199; 12 (suool 1): 3-12.
- 42.- Pastor J, Cuenca R, Velarde R, Viñas L, Lavin S. (1997). Evaluation of a hematology analyzer with canine and feline blood. *Vet Clin Pathol*; 26 (3): 138-147.
- 43.- Pastor J, Cuenca R, Velarde R, Marco I, Viñas L, Lavin S. (1998). Evaluation of a haematological analyzer (Sysmex F-800) with equine blood. *J Vet Med (A)*; 45 (2): 119- 126.
- 44.- Pastor J, Cuenca R, Darnaculleta F, Viñas L, Lavin S. (1998). Evaluación del analizador hematológico de impedancia eléctrica Baker 9120+ con sangre de perro y gato. *Clin Vet Peq Anim*; 18 (4): 207-220.
- 45.- Tvedten H. (1989) The complete blood count and bone marrow examination: general comments and selected techniques. En: Willard MD, Tvedten H, Turnwald GH. *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, pp: 14-35.
- 46.- Weiser MG. (1987). Size referenced electronic leucocyte counting. Threshold and lysed leucocyte size distribution of common domestic animal species. *Vet Pathol* ;24: 560-563.

- 47.- Armijo M. (1989). Dermatosis por hongos. Editorial Médica Internacional SA. Madrid.
- 48.- Campbell CK, Johnson EM, Philpot CM, Wamock DW. (1996). Identification of pathogenic fungi. Public Health Laboratory Service eds. London, UK.
- 49.- Carrillo-Muñoz AJ. (1995) Medios de cultivo en Micología médica y veterinaria. Cuadernos de Microbiología. 3: 2-3.
- 50.- Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C. (1995). Hongos dermatofitos: aspectos biológicos. Actualidad Dermatológica.10/385: 687-694.
- 51.- Ellis D, Davis S, Alexiou H, Pfeiffer T, Manatakis Z. (1992). Descriptions of medical QAP fungi. Gillingham Printers Pty Ltd Underdale, Australia.
- 52.- Ellis D. Clinical Mycology. (1994). The human opportunistic mycoses. Gillingham Printers Pty Ltd Underdale, Australia,
- 53.- . Larone DH. (1986). Medically important fungi. A guide to identification. Harper and Row Publishers. New Cork.
- 54.- Pontón J. (1996). Avances en el diagnóstico de laboratorio de la candidiasis sistémica. Revista Iberoamericano de Micologia. 13: s16-s19.
- 55.- Torres-Rodríguez JM. (1988). Técnica Micológica. En JM Torres Eds. Micosis que afectan piel y mucosas. Doyma. Barcelona. pp 173-181.
- 56.- Rebel G., Taplin D. (1970). Dermatophytes, their recognition and identification 2nd. Miami University Press. Miami. USA.

57.- Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez”. URL disponible en: <http://www.inh.gov.ec/?pageIndex=105>

58.- Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. Programa de Laboratorio Clínico.

59.- Antonio Morilla G. y Carlos R. Bautista G. (1986). Manual de Inmunología. Editorial Diana Técnico.

60.- Alejandro Escobar Gutiérrez, María Luisa Aquino, Silvia Giono Cerezo (1995). Manual de Técnicas de Laboratorio Vol. 1, Virología y Bacteriología. 1ª Edición. Editorial Secretaria de Salud.