



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS BÁSICOS PARA UN
LABORATORIO DE PATOLOGÍA DIAGNÓSTICA EN UN
CENTRO DE RECRÍA DE BOVINOS PRODUCTORES
DE LECHE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

CONSUELO LILIA BARRÓN FLORES

Asesor: M.V.Z. M. Sc. JOSÉ ALFONSO BARAJAS ROJAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O .

	RESUMEN	1
I.	INTRODUCCION	1
II.	SOLICITUD DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .	6
III.	BACTERIOLOGIA Y MICOLOGIA	13
IV.	PARASITOLOGIA	136
V.	SEROLOGIA	150
VI.	HEMATOLOGIA	162
VII.	QUIMICA SANGUINEA	183
VIII.	TOXICOLOGIA	205
IX.	ESTERILIZACION DE MATERIAL	215
X.	BIBLIOGRAFIA	217
XI.	INDICE	221

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS BASICOS PARA
UN LABORATORIO DE PATOLOGIA DIAGNOS -
TICA EN UN CENTRO DE RECRÍA DE BOVI -
NOS PRODUCTORES DE LECHE.

BARRON FLORES CONSUELO L.

Asesor:

M.V.Z. JOSE A. BARAJAS ROJAS.

Este trabajo se elaboró en base a las experiencias adquiridas durante 3 años en el Centro de Recría de Tepotzotlán, Estado de México y en el Centro de Recría del Complejo Agroindustrial Tizayuca, del Estado de Hidalgo, pertenecientes al fideicomiso: "Programa Descentralización de las Explotaciones Lecheras del Distrito Federal." del Banco Nacional de Crédito Rural. Las técnicas y actividades a las que se hace referencia se realizan en el laboratorio para resolver la problemática clínico preventiva que más comunmente se presenta en este tipo de explotaciones (crianza intensiva a destete precoz). Las áreas incluidas son: Bacteriología y Micología, Parasitología, Serología, Hematología, Química Sanguínea, Toxicología, Preparación y esterilización del material del laboratorio.

I N T R O D U C C I O N .

La producción animal representa uno de los más importantes retos que se presentan a nivel mundial. El mayor incremento en la población humana, en relación a los nutrientes que puede obtener a partir de vegetales y animales, indispensable la integración y coordinación de grupos de profesionales que en una forma interdisciplinaria, realicen investigación que repercuta en la producción. El médico veterinario zootecnista como integrante y responsable del logro de esos objetivos en los aspectos pecuarios, requiere de una superación constante para producir carne, leche, huevo y otros subproductos de origen animal, así como evitar la transmisión de enfermedades de los animales al hombre.

La planeación en los aspectos de producción animal se han venido desarrollando bajo parámetros establecidos que actualmente requieren de un ajuste, dada la gran tasa de incremento de la población humana, en México es crítica la problemática de que día a día, las mejores tierras posibles de ser explotadas para la producción son cubiertas con asfalto, quedando reducidas las superficies cultivables. Esto ha motivado entre otros, la necesidad de maximizar la cría y engorda de ganado, siendo los bovinos productores de leche, una de las especies animales que mayor demanda requieren, debido al déficit existente en cuanto a pie de cría y producción de carne, leche y sus derivados.

En el período comprendido de 1971 a 1978 se importaron 129, 115 cabezas de ganado bovino productor de leche, con un valor aproximado de 2,212,221,882 pesos, lo cual representa una considerable fuga de divisas para el país. (8,19,22) No obstante esta situación en México, en la actualidad se producen aproximadamente 6,746 millones de litros de leche anuales, siendo la producción de leche de vaca de 6,475 millones de litros, y de cabra de 270.4 millones de litros para satisfacer la demanda de una población de 66' 768,000 habitantes, dando un promedio de 120.4 litros de leche de consumo per cápita, sin embargo esto no satisface la recomendación de la Organización Mundial de la Salud, que señala un consumo

promedio per cápita de 500 ml de leche por individuo. (8,19)

Por otra parte, es notoria la creciente introducción de leche en polvo, que para 1978 ascenderá a 90,000 toneladas provenientes del extranjero, lo cual origina al país una fuga de divisas del orden de los 879' 750,000.00 pesos.(22)

La producción láctea en México tiene gran importancia económica, participando con un 27.9% en el producto interno bruto del sub-sector pecuario, ocupando un primer lugar con respecto a los otros productos de origen animal. (22)

Una de las soluciones de esta problemática sería: la implantación de programas de crianza, los cuales contemplen una tecnología adecuada adaptada a los recursos existentes y a las condiciones reales de la ganadería en el país; siendo uno de estos recursos la crianza de vaquillas para reposición de los hatos, que evite la pérdida de capitales.

Es evidente que existe inquietud para la producción de ganado en el país, por este motivo es necesario considerar que en la última década, se han creado centros de recría en diferentes estados de la República, entre los que se encuentran:

Centro de Recría del Estado de Coahuila, perteneciente al FIRA (Fondos Instituidos en Relación con la Agricultura) Banco de México, creado en el año de 1969.(36)

Centro de Recría de Calamanda, Queretaro: perteneciente al Fideicomiso 87 de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, formado en 1974. (13)

Centro de Recría de Tepotzotlán Edo. de México. Fideicomiso: Programa Descentralización de las Explotaciones Lecheras del Distrito Federal. Banco Nacional de Crédito Rural, creado en 1974. (11,30)

Centro de Recría del Estado de Aguascalientes (privado), formado en el año de 1975 (11).

Centro de Recría del Complejo Agro-Industrial Tizayuca, Hidalgo. Fideicomiso: Programa Descentralización de las Explotaciones Lecheras del Distrito Federal. Banco Nacional de Crédito Rural. 1977 (11,30)

Este último centro aloja una población mayor a la que se había manejado en otros centros (aproximadamente 14 800 animales); contando con una tecnología apropiada, altamente calificada en los aspectos médico veterinarios, administrativos, económicos y financieros, con un plan de producción intensivo.

Este centro consta de las siguientes etapas:

LACTACION

DESARROLLO I

DESARROLLO II

GESTACION

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO

Es importante la integración de un laboratorio de Diagnóstico, que cuente con elementos para el diagnóstico básico, ya que a través de este se emitirán elementos de decisión para aceptación de becerros, así como para la integración de diagnósticos clínicos por parte de los médicos.

Concluyendo: así surgió la idea de crear este manual, que contiene información de los Métodos y Técnicas necesarios para realizar las pruebas de laboratorio de las muestras clínicas, de los padecimientos de los bovinos en sus diferentes etapas de vida en un Centro de Recría.

Este manual se integró en base a la experiencia obtenida durante los años 1975-1976, en el Centro de Recría de Becerras Holstein Friesian de Tepetzotlán, Edo. de México y en el Centro de Recría del Complejo Agro-Industrial, Tizayuca Hidalgo, en los años 1977 - 1978; ambos centros pertenecientes al Fideicomiso : Programa Descentralización de las Explotaciones Lecheras del Distrito Federal, Banco Nacional de Crédito Rural.

O B J E T I V O S .

1. Elaborar un documento que reuna la información sobre las pruebas de laboratorio, para realizar diagnósticos bacteriológicos, micológicos, parasitológicos, hematológicos, químicos y toxicológicos, de los padecimientos que afectan a los bovinos Holstein en un Centro de Recría.
2. Mediante esta información se pretende minimizar el tiempo y material necesarios para emitir diagnósticos confiables con precisión y aun costo aceptable.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

1. Material de Bacteriología y Micología.
2. Material de Parasitología.
3. Material de Serología.
4. Material de Hematología.
5. Material de Química.
6. Material de Toxicología.
7. Material de Esterilización.
8. Material complementario que se incluye en el texto.

II. SOLICITUD DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.

SOLICITUD DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Esta se realizará a través de una forma impresa la cual será proporcionada por el laboratorio, en la que estarán incluidos los datos básicos en cuanto a identificación del animal, así como los datos clínicos referentes al caso.

La solicitud deberá contener como mínimo los datos siguientes:

Nº Caso _____ -
Fecha _____
Nº de identificación del animal _____ Etapa _____
Clínico que remite la muestra _____
Muestra _____
Condición o conservador en los que se envía la muestra _____
Raza _____ Sexo _____ Edad _____
Historia Clínica _____
Diagnóstico Presuntivo _____
Exámen solicitado _____
Tratamiento con antibióticos Si _____ No _____ Cuáles _____
Fecha del último tratamiento 1/ _____
Técnico que trabaja la muestra 2/ _____

1/ Importante en aislamientos bacteriológicos, ya que debido a la presencia de antibioticos en la muestra, se puede estar inhibiendo el crecimiento en el cultivo.

2/ Se inscribirá el nombre del responsable del área a la que va la muestra, para cualquier comentario del diagnóstico obtenido.

La solicitud también se podrá manejar en forma práctica utilizando formas como la que a continuación se muestra.

Laboratorio de análisis clínicos.

Nº de identificación _____ Nº caso _____ Etapa _____

Fecha de recibido _____ Fecha reporte preliminar _____ Fecha reporte final _____

Bacteriólogo _____ Clínico _____ Patólogo _____

Muestra _____ Condición _____

Raza _____ Sexo _____ Edad _____

Historia clínica _____

Diagnóstico presuntivo _____ Tipo de examen _____

Tratamiento con antibióticos Si _____ No _____ Cuáles _____

EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO
IDENTIFICACION PRELIMINAR

SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS

Penicilina _____	Terramicina _____	Polimixina _____
Estreptomina _____	Tetraciclina _____	Bacitracina _____
Cloranfenicol _____	Furadantina _____	
Eritromicina _____	Kanamicina _____	

IDENTIFICACION FINAL

COMENTARIOS

Solo para uso del laboratorio			
Aerobiosis _____	Anaerobiosis _____	Hongos _____	Micoplasma _____
G.S. _____	G.S. _____	Sab. _____	PPLO.A. _____
Thioglicolato _____		Derm. _____	PPLO.C. _____
S.S. V.B. Mc. Conkey Sel. Tet.		C.C.	
Nº cepario _____	Nº liofilización _____		

LABORATORIO DE ANALISIS CLINICOS

Fecha _____ No. Identificación _____ No. caso _____

MUESTRA				
Tinción Gram				
Medio				
Colonia				
Tamaño				
Descripción				
Hemólisis				
Números				
Sensibilidad				
Subcultivo				
Reincubación				
Coagulasa (placa)				
Coagulasa (tubo)				
Catalasa				
Manitol Sal Agar				
Caldo sangre				
NaCl (6.5%)				
Trealosa				
Sorbitol				
Lactosa				
Leche tornasolada				
Arabinosa				
Loeffler				
Urea				
TSI				
Citrato				
SIM				
MR/VP				
O/F				
Oxidasa				
Motilidad en gota				
Red. Nitratos				
Liq. Gelatina				
Dextrosa				
Manitol				
Maltosa				
Sucrosa				
Inositol				
Dulcitol				
L.D. (lis. Descarboxi)				
F.A. (Fenil Alanina)				
ONPG				
PPLO (caja)				
PPLO (transferencia)				
PPLO (caldo)				

PRUEBAS ESPECIALES Y COMENTARIOS

Las solicitudes de procesamiento podrán ser almacenadas en una carpeta y funcionar como un registro adicional a la libreta de registro interno de las -- muestras recibidas en el laboratorio.

REGISTRO DE MUESTRAS

Este registro se refiere a la recopilación de los datos de las muestras recibidas en el laboratorio, con el objetivo de manejar con mayor facilidad los datos de la muestra y los resultados obtenidos en el laboratorio.

En este registro no será necesario anotar la totalidad de los datos recabados en la hoja de solicitud de procesamiento, a continuación se presentan dos formas de registro que funcionan en forma eficaz:

- en libreta de registro, con hojas foliadas

Fecha	Nº caso	Etapa	Nº identificación del animal
		Muestra	Exámen solicitado
		Resultado:	

- otra forma de registro se puede realizar mediante la creación de un cuaderno de registro, el cual se imprimen las hojas y se encuadernan:

REGISTRO DE HISOPOS PARA DETERMINACION DE SALMONELLA .

Fecha	Técnico	Ganadero	Día y Hora de la siembra	Día y Hora de la lectura	RESULTADOS		Observaciones
					<u>E. coli</u>	<u>Salmonella</u>	

REGISTRO DE NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS.

Fecha	No. Arete	Ganadero	ZnSO ₄	Comentarios

III. BACTERIOLOGIA Y MICOLOGIA.

IMPORTANCIA DE LAS TECNICAS DE RECOLECCION DE MUESTRAS PARA AISLAMIENTOS
BACTERIOLOGICOS Y MICOLOGICOS

La importancia de las técnicas de recolección radica en que están directamente relacionadas con el resultado que se espera obtener en los estudios solicitados. Existen un gran número de microorganismos que se pueden encontrar como saprofitos o flora normal en diferentes lugares como son: medio ambiente, agua, piel, pelo, vías respiratorias altas, cavidad oral, intestino, ano, vulva, vagina, etc., por lo cual es necesario conocer esta flora para poder apreciar si realmente los microorganismos obtenidos a través del cultivo son los causantes del problema.

En el caso de la toma de muestras a partir de un cadáver, esta práctica deberá realizarse bajo condiciones de asepsia adecuadas y en un corto tiempo posterior a la muerte, ya que existen fenómenos de migración bacteriana (de intestino hacia todo el organismo) y autólisis, las cuales pueden alterar o dificultar el aislamiento de gérmenes realmente patógenos.

Otras consideraciones a tomar en cuenta son:

- Estar seguro que las muestras enviadas al laboratorio son las adecuadas y características del problema de que se sospecha.
- Al tomar la muestra debe hacerse bajo las mejores condiciones de asepsia, evitando la contaminación con pelos, heces, polvo y suciedad en general.
- Si la enfermedad o problema representa un problema de hato, se seleccionan para muestreo los animales que presenten la fase más adelantada de la enfermedad.
- La muestra debe ir acompañada con la información completa de los antecedentes clínicos del caso, de una buena identificación y con la solicitud específica de los estudios que se pretende se realicen a la muestra.

Datos mínimos que deben acompañar una muestra:

- Fecha.
- Nombre y dirección del propietario.
- Especie, raza, edad y sexo del animal.
- Historia clínica:
 - . Duración de la enfermedad.
 - . Número de animales afectados.

- . Signos clínicos.
- . Mortalidad.
- . Tipo de alimento suministrado.
- . Hallazgos a la necropsia.
- . Tratamientos y última fecha de aplicación.
- Diagnóstico presuntivo.
- Tipo de conservador utilizado en la muestra antes de su envío al laboratorio.
- Tipo de estudio que solicita.
- Clínico responsable del caso, dirección y teléfono.

Las muestras más comunmente tomadas se clasifican en 7 grupos y dependiendo éstos, son las técnicas a seguir:

- Tejidos.
- Organos.
- Orina.
- Sangre.
- Exudados.
- Fluidos.
- Raspados de piel.
- Organos y tejidos.

Generalmente se obtienen por procesos quirúrgicos o a la necropsia, debe de realizarse en condiciones de esterilidad o con la mayor asepsia posible con la finalidad de evitar contaminaciones. En el caso de muestras obtenidas a la necropsia se utilizan mecheros portátiles (difícil en casos de campo) e instrumental debidamente esterilizado (flameado).

Las muestras se obtienen del área que presenta la lesión más amplia y característica de la enfermedad y en cantidad suficiente que permita la toma de muestras subsecuentes en el laboratorio. Se colocarán preferentemente en frascos o cajas de petri estériles.

- Orina.

Las muestras de orina se pueden obtener por:

- . Estimación mecánica de la micción, por masaje alrededor del clítoris o de la vulva, por compresión de la vejiga vía rectal. Se eliminan los primeros chorros de orina y el resto se colecta en frascos estériles.
- . Aplicación sistémica de compuestos diuréticos. La colección se efectúa igual que en el caso anterior.
- . Por sondeo uretral, con sonda estéril y captación de la orina en frasco estéril.
- . Por punción directa de la vejiga a través de la piel (percutánea), con aguja y jeringa estériles. En este caso se recomienda sellar la jeringa y mandarla al laboratorio, con el fin de evitar posibles contaminaciones, en el vaciado de la jeringa hacia el frasco estéril.

Las muestras de orina serán enviadas al laboratorio lo antes posible y en condiciones de refrigeración. El tiempo transcurrido entre la toma de la muestra, la observación de ésta y su cultivo de ser posible no deberá ser mayor de 3 horas, debido a que algunos compuestos de la orina sufren procesos de degradación (amoníaco) y llegan a ser tóxicos para algunos microorganismos.

- Sangre.

Se obtiene por punción directa de algún vaso (caudal y/o vena yugular), por medio de aguja estéril y jeringa tratada con algún anticoagulante (EDTA, heparina, oxalatos, etc.), y esterilizada. Se desinfecta la zona de punción y un radio aproximado de 10 cm. Se recomienda enviar la muestra en la jeringa con que se obtuvo para evitar contaminaciones.

- Exudados y fluidos.

Se pueden coleccionar por medio de hisopos o directamente en frascos estériles si la cantidad y localización lo permitan. En el caso de fluidos se pueden obtener con jeringa y aguja estériles por medio de punción directa, la zona de punción se desinfecta en forma similar a la que se sigue para la obtención de muestras de sangre.

Cuando la muestra ha sido obtenida por medio de hisopos, éstos son introducidos en un medio de transporte (de los que se hablará más adelante) o en frascos estériles y enviados al laboratorio rápidamente, ya que los hisopos sufren procesos de desecación que causan la muerte de gran número de gérmenes. Los hisopos no deben ser transportados en cualquier medio de cultivo (caldo nutritivo) de los más usados comúnmente, ya que se

puede favorecer el crecimiento de saprofitos indeseables, los cuales inhiben por competencia el crecimiento de gérmenes patógenos.

- Raspados de piel.

Por lo general la toma de estas muestras se efectúa para la realización de estudios micológicos, por lo cual la técnica varía:

- . Selección de la zona para la toma de muestras. Debe ser la que represente la lesión más amplia y característica (zonas alopécicas, de forma irregular, de aspecto asbestoso y reseco, generalmente localizado en cabeza y cuello de animales jóvenes).
- . Se lava la zona lesionada con jabón y agua, se aplica un solvente de la grasa (alcohol o éter), se espera a que los residuos del desengrasante se evaporen y se procede a tomar la muestra.
- . El raspado se efectúa de la periferia de la lesión (nunca del centro), debido a que en esta zona se encuentra una mayor proliferación de micelios y presencia de conidias, (por medio de los cuales se realiza la identificación se toma también pelos arrancados desde su raíz para apreciar el tipo de lesión que presentan, lo cual contribuye a la identificación).

Su envío al laboratorio se puede realizar en frascos o cajas estériles (no necesariamente), sobres de papel o presionados entre dos portaobjetos.

MEDIOS DE TRANSPORTE AL LABORATORIO.

La generalidad de las muestras para estudios bacteriológicos y micológicos deben ser enviadas en condiciones de esterilidad y refrigeración (nunca congeladas, debido a que hay destrucción celular excepto L. monocitogenes) y lo más rápidamente posible.

En el caso de la toma de muestras por medio de hisopos se pueden utilizar medios de transporte como el de Stuart ^{1/}, el cual mantiene las muestras en condiciones viables (no es un medio de enriquecimiento), medio semisólido altamente reductor que inhibe la autodestrucción enzimática, previene los efectos letales de la oxidación, manteniendo a los microorganismos de la muestra en estado "quieto". Viene en presentaciones tanto para gérmenes aérobios como anaérobios.

^{1/} Composición ver índice Stuart medio de transporte.

CUADRO DE REFERENCIA PARA EL CULTIVO DE MUESTRAS
PARA BACTERIOLOGIA Y MICOLOGIA

Tipo de muestra	Microorganismos probables presentes	Tinción o demostración directa	Medios a utilizar
1. Torunda nasal	Staphylococcus	1	Gelosa sangre Agar Mycoplasma con penicilina y acetato de talio. Caldo thioglicolato
	Streptococcus	1	
	Pasteurella	1	
	Haemophilus	1	
	Corynebacterium	1	
	Mycoplasma	2	
	E. coli	1	
	Klebsiella	1	
	Bordetella	1	
	Pseudomonas	1	
2. Lavado traqueal	Aspergillus	1.3	Los mismos que N°1 Procedimientos especiales cuando se trata de Mycobacterium
	Cryptococcus	4	
	Los mismos que N° 1 más:		
	Mycobacterium	5	
3. Torunda de oído	Nocardia	6	Gelosa sangre Caldo thioglicolato
	Coccidioides	7.3	
	Staph., Strep	1	
	Pseudomonas	1	
	Proteus	1	
	Klebsiella	1	
4. Torundas y líquido sinovial	E. coli	1	Gelosa sangre Caldo thioglicolato Agar mycoplasma P-T Embrión de pollo
	Corynebacterium	1	
	Aspergillus	1.3	
	Staph., Strep.	1	
	E. coli	1	
	Erysipelothrix	1	
	Actinobacillus	1	
	Haemophilus	1	
5. Raspados de piel	Mycoplasma	2	Saboureaud con ciclohexamida y cloranfenicol o medio prueba de Dermatofitos (DTM)
	Salmonella	1	
	Chlamydia	8	
	Dermatofitos	7	
	Microsporium	7	
	Trichophyton		

Tipo de muestra	Microorganismos probables presentes	Tinción o demostración directa	Medios a utilizar
6. Pústulas y costras de piel	Staph, aureus Dermatophilus B-Strep	1 1 1	Gelosa sangre Caldo Thioglicolato
7. Pus y líquidos pleurales y peritoneales	Staph., Strep Corynebacterium Pasteurella Actynomyces Actinobacillus E. coli Haemophilus Pseudomonas Bacteroides Clostridium Nocardia Coccidioides	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1.6 3.7	Gelosa sangre en condiciones aerobias Caldo Thioglicolato
8. Líquido cerebroespinal	Staph., Strep Corynebacterium Haemophilus Listeria E. coli Cryptococcus Mycoplasma	1 1 1 1 1 4 2	Gelosa sangre Caldo thioglicolato Agar Mycoplasma P-T
9. Organos perenquimatosos	La mayoría de los organismos ya mencionados más: Salmonella (intestino) Mycoplasmas, hongos (pulmón) Clostridium (hígado) Bacteroides (Fusobacterium) y Clostridium (tej. necrótico) Haemophilus (cerebro Bovinos) Leptospira (riñón)	1 3.7 1 1 1 1 9	Gelosa sangre caldo thioglicolato Agar Mycoplasma 2 Aerobio y Anaerobio Medio de Fletcher
10. Sangre	Strep., E. coli Klebsiella Erypelothrix Staph Bacillus	1 1 1 1 1	Caldo thioglicolato o caldo peptona

Tipo de muestra	Microorganismos probables presentes	Tinción o demostración directa	Medios a utilizar
11. Exudados de fisulas	Actinomyces	1	Gelosa sangre
	Staph	1	Aerobia y anaerob
	Bacteroides	1	Caldo thioglicola
	Corynebacterium	1	to
	Coccidioides	1	Saboureaud con C
	Nocardia	1	y C
12. Materia fecal	E. coli	1	Agar Mac Conkey
	Salmonella	1	Agar verde brillan
	Klebsiella	1.9	te
	Pseudomonas		Caldo Selenite o
	Proteus	1	tetratonato
	Enterococcus	1	E.M.B.
Mycobacterium	5		
13. Orina	E. coli	1	Agar Mac Conkey
	Proteus	1	Gelosa sangre
	Pseudomonas	1	Caldo thioglicola-
	Staph., Strep	1	to
	Klebsiella	1	Medio de Fletcher's
	organismos entéricos	1	
	miceláneos	1	
	<u>Corynebacterium renale</u>	1	
	Leptospira	10	
Mycobacterium	5		
14. Exudado ocular	Staph., Strep	1	Gelosa sangre
	Pseudomonas	1	Agar Mycoplasma
	Neisseria	2	Agar Saboureaud
	Mycoplasma	1	Embrión de pollo
	Moraxella	1	
	Haemophilus	1	
	Aspergillus y otros	1.3	
	hongos		
Chlamidias	8		
15. Fetos abortados	Brucella	1	Gelosa sangre
	Campylobacter	1	Aerobia y anaero
	Strep.	1	bia
	E. coli	1	Caldo thioglicola-
	Klebsiella	1	to
	Salmonella	1	Saboureaud
	Mucor	3	Embrión de pollo
	Absidia	3	Medio Fletcher's
	Chlamydia	8	
	Leptospira	10	

Tipo de muestra	Microorganismos probables presentes	Tinción o demostración directa	Medios a utilizar
16. Leche	Strep., Staph.	1	Gelosa sangre
	E. coli	1	Prueba de Hotis
	Klebsiella	1	Prueba CAMP.
	Pseudomonas	1	Agar Mycoplasma
	Mycoplasma	3	
	Corynebacterium	1	
	Mycobacterium	5	

-
1. Tinción de Gram
 2. Tinción de Giemsa
 3. Tinción periódica ácida de Schiff (PAS)
 4. Preparación fresca con tinta china
 5. Ziehl Neelsen
 6. Kinyoun
 7. Preparación fresca con KOH al 15%
 8. Maquiavelo
 9. No se hace
 10. Campo obscuro

LOS 3 ASPECTOS BASICOS EN EL DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO SON:

1. Demostración
2. Aislamiento
3. Identificación

1. Demostración.

Tiene por objeto la visualización del agente patógeno o su efecto en el material biológico: Tejidos, secreciones, excreciones, exudados, trasudados contenido estomacal, intestinal, etc.

Ventajas.

Se obtienen resultados inmediatos.

Requerimientos mínimos de equipo, tiempo, técnicas de laboratorio, espacio de trabajo, material, etc.

Puede ser el único método de diagnóstico viable, como en el caso de que los organismos problema no puedan ser cultivados in vitro (*M. leprae*), o poseer características de cultivo especiales (nutrientes: vitaminas, factores de crecimiento, etc).

Nos puede orientar tentativamente a un diagnóstico y tratamiento rápido.

En el caso de enfermedades relacionadas con la producción de toxinas potentes, la demostración de éstas es de mayor importancia que el aislamiento del microorganismo por ejemplo: en el caso de *Clostridium perfringens*.

Nos puede dar una idea de la cantidad de gérmenes relacionados en el proceso de infección, forma, tamaño y disposición.

Permite la observación de algunas reacciones tisulares y elementos que intervienen en el proceso de infección (ejemplo: Fagocitosis, tipo de leucocitos asociados en el proceso, fibrina, destrucción o degeneración celular, etc.)

Nos muestra sus características de Tinción.

Limitaciones.

Se requiere la presencia de grandes cantidades de microorganismos para la obtención de resultados positivos.

Se calcula que aproximadamente por cada bacteria que se observa al microscopio con el objetivo de inmersión existen aproximadamente 10^6 bacterias por mililitro del fluido o substancia o aproximadamente 5×10^4 bacterias por ml. o gramo de muestra

para la observación de una de ellas al microscopio.

En la mayoría de los casos no proporciona respuesta de la acción de toxinas, anticuerpos, etc. relacionados con el proceso "in vivo". Respuestas más específicas se pueden obtener con el uso de anticuerpos marcados (fluoresceína, ferritina, enzimas, etc.)

2. Aislamiento.

La etapa de aislamiento consiste en el transporte y cambio de los microorganismos del medio natural donde se encuentran a un medio artificial (medios de cultivo y animales de experimentación), para su propagación en cultivo puro.

Ventajas.

Es la forma más convincente del diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas.

Prerrequisitos indispensables para la identificación de los agentes microbianos salvo algunas excepciones.

Requerido para una determinación correcta de la sensibilidad a los diferentes antibióticos y sulfas.

Desventajas.

Requiere de tiempo, equipo, conocimiento y experiencia.

Puede ser peligroso para el personal de laboratorio.

En algunas ocasiones se puede llegar al diagnóstico con técnicas menos laboriosas como examen clínico, clínico patológico, examen directo, etc.

Métodos.

Principios básicos. El objetivo es el de obtener el germen problema en cultivo puro para su posterior identificación.

Recomendaciones:

Obtener una muestra del material sospechoso a examinar en condiciones estériles y sembrar en estría con objeto de aislarlo en cultivo puro (véase técnica de aislamiento en cultivo puro).

Si se sospecha de contaminación de la muestra, se recomienda el siguiente procedimiento para reducir al máximo la posible contaminación.

a) Esterilizar la superficie del órgano o muestra con una espátula caliente.

b) Por medio de filtración selectiva como en el caso de purificación de muestras sospechosas de contener Vibrio o Leptospira. Se utiliza un filtro especial Swinney e una jeringa de 5 ml. éstos filtros poseen una membrana con una porosidad de 650 nanómetros o sea 6 500 Amstrongs. Cuidadosamente filtre el líquido problema depositándolo en un tubo estéril.

Precaución: El inóculo o sustancia a filtrar debe estar libre de materia gruesa (contenido intestinal sin digerir, coágulos de fibrina, etc.), de otra manera se producirá la obliteración del filtro y la posible ruptura de éste por la presión produciendo peligrosos aerosoles para el personal del laboratorio.

c) Por centrifugación selectiva como en el caso de Leptospira en exámenes de orina, centrifugar a 2 000 r.p.m./30 minutos a la cual se producirá la sedimentación de las bacterias quedando las leptospiras en el sobrenadante.

d) Desinfección selectiva.

- Mycobacterium (ver página
- Erysipelothrix (con fenol al 0.25% durante 30 minutos)
- Clostridium (a 80°C durante 30 minutos).
- Virus (100 u de penicilina, 50 ug. de estreptomcina/ml del medio a utilizar en caso de que se sospeche de contaminación bacteriana incubar a 37°C/30 minutos.

e) Inhibidores selectivos en los medios de cultivo.

Como en el caso de gérmenes entéricos, esta filococos, virus, micoplasmas, hongos, etc.

f) Por medio de diluciones como en el caso de Leptospira.

g) Inoculación a animales de laboratorio, como en el caso de Clostridium, Leptospira, Bacillus anthracis, Coccidioidomycosis, etc.

Los medios sólidos son utilizados preferentemente para el aislamiento de colonias individuales con objeto de estudiar su forma, tamaño, color, consistencia, características de producir hemólisis, etc.

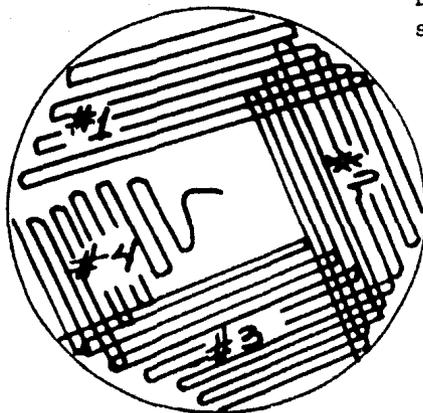
Las técnicas de inoculación modificadas dependerán del número de microorganismos sospechosos de crecer.

- Esta técnica es muy importante puesto que dependiendo del número de cuadrante de la caja que se observe crecimiento, se relacionará con la cantidad de gérmenes existentes en el caso problema.

- La técnica a seguir es la siguiente: 1/

Se dividirá la caja de petri en cuatro cuadrantes imaginarios en los cuales se efectuarán cuatro siembras en estría con el cultivo problema se empezará con una estría lo mas estrecha posible con objeto de obtener un mejor crecimiento de la muestra original; se recomienda que ésta primera estría se realice con la muestra de órgano o hisopo que contenga a la muestra problema, en seguida se procederá a flamear el asa de platino y se efectuará la segunda estría a partir de uno de los extremos de la primera, y así sucesivamente a manera de hacer "diluciones" de la muestra original.

INTERPRETACION DE LA SIEMBRA 2/



El crecimiento se reporta como	Si se encuentran 5 colonias por área	Si existen 5 colonias por área
1 +	1 #	# 2
2 +	2 #	# 3
3 +	3 #	# 4
4 +	4 #	-

1/ Técnica de siembra en cultivo puro:

2/ Hoeprich, Infections diseases, p. 104
Harper of Row, 1973

- En ocasiones se utilizarán medios de enriquecimiento como en el caso de Salmonella (selenite y tetrathionate), o en caso de problemas de mastitis en los cuales se utilizarán medios especiales para el aislamiento de Staphylococcus y Streptococcus.

Selección de medios de cultivo.

Gelosa sangre al 5% (se puede utilizar sangre de bovino, ovino, equino, etc., dependiendo de la experiencia previa que se tenga o de situaciones especiales dependiendo de la especie animal más comunmente presente en casos de diagnóstico microbiológico).

Este es un medio de cultivo universal utilizado en microbiología.

Caldo thioglicolato de Brewer, el cual es un medio de enriquecimiento con la característica de servir para aislamiento de gérmenes anaerobios y aerobios dependiendo de la localización del crecimiento en el tubo de cultivo.

Estos dos medios son utilizados en la mayoría de las muestras que llegan al laboratorio de diagnóstico de microbiología con excepción de muestras fecales y raspados de piel.

Agar Saboureaud, utilizado cuando se sospecha de la presencia de hongos en el diagnóstico o patológico, o en ocasiones cuando se observó al microscopio estructuras parecidas a las esporas o micelios característicos de éstos. Generalmente el medio es incubado a temperatura ambiente, en caso de muestras altamente contaminadas como en el caso de raspados de piel se utilizarán los medios de agar cicloheximida y cloranfenicol que inhibirán el crecimiento de bacterias indeseables o en caso de que se sospeche de Dermatofitos se utilizará el medio para dermatofitos que es un medio base de Saboureaud conteniendo clortetraciclina, gentamicina y rojo de fenol como indicador.

Nota: No obstante la utilización de medios de Saboureaud con teniendo antibióticos los cuales tienen un efecto principal en la inhibición de bacterias y hongos saprofitos se debe tomar en cuenta que existen hongos patógenos que también pueden ser inhibidos por estos antibióticos como en el caso de Cryptococcus, Allescheria boydii, Aspergillus spp., etc.

Por lo tanto se recomienda que no se utilicen medios selectivos si no se requieren primordialmente.

Medios para Micoplasma.

Inocular la muestra problema en el medio para Micoplasma cuando su origen sea el siguiente:

Tracto respiratorio, articulaciones, tracto genital, exudado ocular, leche de casos de mastítis, tejido nervioso central o líquido cefalorraquídeo.

Para especímenes contaminados como por ejemplo torundas de nasofaringe y ojo se debe de utilizar agar Micoplasma con acetato de talio y penicilina.

Medios selectivos

(S.S., Verde Brillante, Mac Conkey, etc.). Para microorganismos enteropatógenicos presentes en excremento, orina y otros materiales que puedan contener estos microorganismos.

Condiciones de incubación.

Atmósfera.

Todos los cultivos primarios deberán ser incubados en una atmósfera de dióxido de carbono al 5% ó 10%, con excepción de las cajas de agar Saboureaud.

Todas las muestras originarias de material purulento, tejido necrosado, etc., deberán ser sembradas en una segunda caja de gelosa sangre e incubarlos en condiciones de anaerobiosis con un 95% de hidrógeno y un 5% de CO₂.

Nuestro método:

- Colocar las cajas y tubos en la jarra para anaerobiosis.
- Cerrar la caja y eliminar el aire con una bomba de vacío.
- Agregar hidrógeno y conectar eléctricamente por medio de la extensión durante 15" (para eliminar el oxígeno restante con la subsecuente formación de agua).
- En ocasiones se recomienda introducir junto con el H₂ aproximadamente 100 ml de CO₂ en cada jarra.

Un método más conveniente es comprar "Gaspak" e indicadores en "Baltimore Biological-Laboratories".

Temperatura.

- La temperatura de incubación de rutina es de 37°C.

- La temperatura de incubación para *Leptospira* es de 29-30°C.
- La temperatura de incubación para los hongos es de 22-25°C.
- La temperatura para la prueba de sensibilidad a antibióticos es de 35°C. (para la preparación del inoculo en la fase log.).

Nota: La temperatura de incubación rutinaria de 37°C, se recomienda también para algunas pruebas diferenciales como las de Voges Proskauer, desarrollo de flagelos, etc.

Las muestras sospechosas del contenido de hongos (con excepción de los dermatofitos) deberán de ser sembrados en Agar Saboureaud (incubado a temperatura ambiente), y en gelosa sangre (incubado a 37°C).

Medidas de seguridad.

Los cultivos de microorganismos capaces de afectar al hombre por contacto en el laboratorio principalmente por la vía aérea deberán de ser manejados con el máximo de precauciones con el fin de reducir los riesgos de infección.

Los hongos causantes de las micosis sistémicas son de los agentes más peligrosos en el laboratorio, por esa razón se recomienda el uso de tubos de cultivo con tapón largo de algodón.

Cuando el crecimiento ha sido abundante se puede cubrir con solución salina fisiológica con una jeringa a través del tapón con objeto de evitar el riesgo de aspiración de esporas al trabajar la muestra.

Muchos microorganismos importantes en medicina veterinaria pueden estar bastante contaminados por otros hongos que su inoculación o siembra en una superficie pequeña del medio de cultivo ofrecerá pocas posibilidades de crecimiento, por esa razón se acostumbra sellar las cajas con "masking tape", o utilizar cajas desechables de plástico a través de las cuales se puede realizar la inyección de soluciones sin peligro de contaminaciones.

El uso de cámaras o campanas de aislamiento es indispensable en un laboratorio para el manejo de hongos y otros microorganismos importantes en salud pública.

I D E N T I F I C A C I O N .

- A. Inocular una colonia en:
1. TSI (triple azúcar hierro)
 2. UREA
 3. SIM o medio de motilidad de Gillies

- B.- Realizar prueba de oxidasa
C.- Referencias en tablas pags.

		EL GRUPO NO ENTERICO	Ver Pág.
		<i>Alcaligenes baecalis</i> (#5)-1	
		<i>Bordetella bronchiseptica</i> (#5)-1	
A)	EL GRUPO ENTERICO Y SUS REACCIONES EN TSI* Ver Pags.	<i>Branhamella ovis</i> (#5)-1	
	<i>Citrobacter intermedius</i> (#1,#3)	<i>Brucella canis</i> (#5)-1-II	
	<i>Edwardsiella tarda</i> (#2)	" spp (#5)-1	
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (#1 y #3)	EF IV (#3)	
	<i>Enterobacter cloacae</i> (#1 y #3)	<i>Flavobacterium</i> spp (#5)-1	
	<i>Erwinia herbicola</i>	<i>Francisella tularensis</i>	
	<i>Escherichia coli</i> (#1,#3,#4)	<i>Haemophilus "agni"</i>	
	<i>Hafnia</i> (#3)	" <i>hemoglobinophilus</i>	
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (#1)	" <i>gallinarum</i>	
	" <i>pneumoniae</i> (#1 y #3)	" <i>haemolyticus</i>	
	<i>Proteus inconstans</i> (#3)	" <i>influenzae</i>	
	" <i>morganii</i> (#3)	" "oakley"	
	" <i>mirabilis</i> (#2,#3,#4)	" <i>paragallinarum</i>	
	" <i>rettgeri</i> (#1 y #3)	" <i>parainfluenzae</i>	
	" <i>vulgaris</i> (#4)	" <i>parasuis</i>	
	<i>Salmonella arizonae</i> (#2, #4)	" <i>suis</i>	
	" spp. (#2, #3)	<i>Moraxella bovis</i> (#5)-1	
	<i>Serratia liquefaciens</i> (#1, #6)	" <i>lacunata</i> (#5)-I	
	" <i>marcescens</i> (#7, #6)	" spp (#5)-II	
	<i>Shigella</i> (#3)	<i>Pasteurella haemolytica</i> (#6)	
B)	EL GRUPO NO ENTERICO Y SUS REACCIONES EN TSI	<i>Neisseria</i> spp (#5)-II	
	<i>Acinetobacter</i> (#5)-I-II	<i>Pasteurella multocida</i> (#6)	
	<i>Actinobacillus equuli</i> (#6)	" <i>pneumotropica</i> (#6)	
	" <i>lignieresii</i> (#6)	" spp (#6)	
	" spp (#6)	" <i>ureae</i> (#6)	
	" <i>suis</i> (#6)	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (#7)	
	<i>Aeromonas</i> spp (#1, #3)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (#5)-1	
		" <i>fluorescens</i> (#5)-1	
		" <i>maltophilia</i> (#5)-1	
		<i>Streptobacillus moniliformis</i>	
		<i>Campylobacter fetus</i>	
		Subesp. <i>jejuni</i> (coli)	

Continúa

Continuación

Ver Págs.

Subesp. setus
" intestinalis
<i>Campylobacter sputorum</i>
Subesp. bubulus
" sputorum
" fecalis
<i>Yersinia enterocolitica</i> (#6)
" pestis (#3)
" pseudotuberculosis (#3)

* Ver medios

** Si los organismos son variables en tinción de Gram, realizar la prueba de KOH. pág. (12)

*** No agrupado con entéricos.

Bacilos y Cocobacilos Gram Negativos

(TSI Reacción # 1)

Fondo ácido, superficie ácida, gas y no H₂S

	Serratia				Enterobacter				Plesiomonas		
	Klebsiella	Citrobacter	proteus	lique -	marces	Erwinia	Aeromonas		Shigelloides		
	E.coli	pneumoniae	intermedius	rettgeri	faciens	cens	aerogenes	cloacae	herbicola		
Ureasa	-	+	d	+	d	d	-	d	d	-	-
Indol	+	d	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Motilidad	+1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Citrato	-	+	+	+	+	+	+	+	d	d	-
Kojo de Metilo	+	-2	+	+	d	d	-	-	d	d	+
Voges Proskauer	-	+	-	-	d	+	+	+	d	d	-
P.D.	-	-	-	+	-	-	-	-	d	-	-
			Sorbitol	(+)	(+)	+	d	d	d	-	-
			Inositol	+	(+)	+	(+)	d	d	-	+
			Arabinosa	+	-	+	+	+	+	d	-
			Aldonitol	d	d	+	d	-	-	-	-
			Celobiosa	d	(+)	+	+	d	d	d	-
		Liq. de Gelatina(37 °C)		+	+	d3	d3	d	d	+	-
		L.D.		d	+	+	-	-	-	d	+
		Esculina				+	-	d	d	d	-
								Red. Nitratos		+	+
								Cre.en Mc Conkey		+	+

- (+) - Acido, sin producción de gas
d - Diferentes tipos
LD - Lisina descarboxilasa
PD - Fenil alanina deamiasa

(TSI Reacción # 1)

1. Existen cepas no móviles. Comprobar con el medio de motilidad de Gillies o por el método de gota suspendida.
2. Existen cepas Rojo de Metfílico positivas.
3. Licuefacción retardada de la gelatina. O no en una forma total.
4. Se presentan cepas con pigmento rojo y no pigmentadas también. Serratia sp. Son resistentes a Polimixina B, mientras que Enterobacter sp son susceptibles.
5. El género Aeromonas tiene numerosas subespecies. Muchas cepas son hemolíticas y algunas pruebas bioquímicas son positivas sólo en incubación a temperatura ambiente. Aislado principalmente como patógeno en animales inferiores (reptiles, peces).

Producción de:	1.A hydrophila subesp.		2.A punctata subesp.			3.A salmonicida subesp.		
	hydrophila	anaerogenes	proteolytica	punctata	caviaes	Salmonicida	achromogenes	masou-cida
Gas de glicerol	+	-	-	-	-	+	-	+
Gas de glucosa	+	-	-	+	-	+	-	+
LD (técnica de Moller)	-	-	+	-	-	-	-	+
	<u>Biotipos</u>							
Voges-Proskauer	+ ¹ -	+ ² -	+	-	-	-	-	+
Prueba de oxidación de gluconato	+ -	+ -		-	-	-	-	+
Desdoblamiento de:								
-Galactosa	+	+	-	+	+	+	+	+
-Sucrosa	d	+	-	d	+	-	+	+
-Manitol	+	+	+	d	+	+	-	+
-Arabinosa	d	+	-	d	+	+	-	+
-Esculina	d	d	-	d	+	+	-	+

- a. + = positivo; - = negativo; d = algunas cepas positivas, algunas negativas
- b. Puede ser una reacción positiva retardada
- c. Existen cepas aberrantes
- LD. = Lista descarboxilasa

(TSI Reacción # 2)

1. Se agrupan en oleadas en gelosa sangre.
2. Hacer pruebas serológicas polivalentes para Salmonella (grupos A - I):
 - a. Agregar una gota de solución salina a un portaobjetos limpio.
 - b. Mezclar una asada de cultivo para hacer una suspensión. Agregar una gota pequeña de suero polivalente contra Salmonella (cubriendo los grupos A hasta I).
 - c. Rotar el portaobjetos hacia adelante y atrás y observar agrupamiento o aglutinación. Una buena iluminación en forma oblicua ayuda bastante. ¡EVITE CONTAMINAR SUS DEDOS!
 - d. Si la reacción es positiva, repetir los pasos a, b, c, substituyendo el suero polivalente por el de cada uno de los grupos específicos.
3. Salmonella gallinarum y Sal, pullorum no son móviles.
4. Sal, cholerasuis y Sal typhisuis (grupo C I) son citrato negativos y pequeños productores de H₂S.
5. Reacción en TSI más frecuente: fondo ácido, superficie ácida, gas H₂S (#4) (ver pág.)

NOTAS:

- a. Salmonella sp. son sensibles a la cloromicetina, furadantina y polymixina B y gentamicina.
- b. Salmonella typhimurium (grupo B) es la especie más común de este grupo encontrado en animales.
- c. Las infecciones del tracto urinario debidas a Proteus mirabilis han respondido en forma consistente al tratamiento con niveles moderados o altos de penicilina.

Bacilos y Cocobacilos Gram Negativos

(TSI Reacción # 2)

Fondo ácido, superficie alcalina, gas y H₂S

	Proteus ² mirabilis ¹	Salmonella spp ²	Salmonella arizonae	Edwardsiella tarda	Citrobacter freundii ⁵
Ureasa	+	-	-	-	d
Indol	-	-	-	+	-
Motilidad	+	+ ³	+	+	+
Citrato	(+)	+ ⁴	+	-	+
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	d	-	-	-	-
ONPG	-	-	+	-	+
L D	-	+	+	+	-
Arabinosa	-	+	+	-	+

d - Diferentes tipos

ONPG - O-nitrofeinl-B-D-galactopiranosido

L D - Lisina descarboxilasa

(+) - Reacción retardada

Bacilos y cocobacilos Gram negativos
 Fondo ácido, superficie alcalina, gas variable y no H₂S

(TSI Reacción # 3)

	Kleb- siella		Vibrio		<u>PROTEUS</u>			<u>Yersinia</u>			Citro- bacter		<u>Enterobacter</u>				
	E.coli	moniae	lyticus	mirab- ilis11	mor- gani	reti geri	incon stans2	pseudo tb.8	Salmo- nella3	Haf nia	inter- medius	Shi- galla4	Aero- monas6	Aero- genes	cloacae	EF4	
Ureasa	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	d	-	-	-	d	-
Indol	+	d	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	d	+	-	-	-
Moti idad	+1	-	+	+	+	+	+	+7	-	+	+	+	-	+	+	+	-
Oxidasa	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
P.D	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	+	+	+	-	+	+	-	-	d	+	+	-	+	+	+	-
Rojo de metilo	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+	d ₁₀	+	+	+	-	d	-
Voges-Proskauer	-	+	d	-	-	-	-	-	-	-	+	d	-	-	+	+	-
							ONPG	+	+	-	+	d	-	+	+	+	-
							LD	-	-	+	+	-	d	+	-	-	-
								Liq.Gelatina(37°C)					d	d5	d5	-	
												Sorbitol	+	d	-	-	
												Inositol	+	(+)	-	-	
												Arabinosa	+	+	-	-	
												Adonitol	+	d	-	-	
												Celobiosa	+	+	-	-	
												Esculina	+	-	-	-	
												Of (glucosa)			F	F	
												Nitrato			+	+	
												Pigmento			+	+	

d- diferentes tipos
 PD- Fenil-alanina deaminasa
 LD- lisina descarboxilasa
 F- fermentación
 (+)- acidez, sin producción de gas
 *- amarillento.

(TSI Reacción # 3)

1. Existen cepas no móviles.
2. Las subespecies del grupo A producen en la glucosa y fermentan el adonitol, las del grupo B no.
3. Hacer prueba serológica polivalente para *Salmonella* (ver reacción # 2 en TSI).
4. Hacer prueba serológica para *Shigella*.
5. Licuefacción retardada de la gelatina, o no en una forma total.
6. Para más pruebas ver la pág. (31)
7. Prueba a temperatura ambiente (aprox. a 25°C).
8. *Yersina pseudotuberculosis* se debe diferenciar de *Yersina enterocolitica* (también en la pág.42).

	Y. pseudotuberculosis	Y. enterocolitica
Esculina	+	- -
Ramposa	+	- -
Sucrosa	- -	+

9. Confirmar por susceptibilidad a fagos y prueba de patogenicidad.
10. Positiva si hay crecimiento a temperatura ambiente.
11. Sumamente rara en esta categoría (ver reacción en TSI #2).

NOTAS:

- a. Dos organismos incluidos en este grupo pero raramente encontrados en animales son:
 1. *Shigella* - confinada a primates; debe ser identificada serológicamente como miembro de este género.
 2. *Alkalescens-Dispar* (grupo AD). No son productores de gas, no móviles, lactosa variables y que son considerados como *E.Coli* si otras características serológicas y bioquímicas concuerda con el grupo *Escherichia*.
- b. *Aeromonas spp* pueden crecer mejor a temperatura ambiente.
- c. E.F.-4 (Fermentadores Eugónicos) son incluidos porque se han aislado de tres pulmones de gato con lesiones similares al muerto. Ferme tan la glucosa por lo tanto causan una reacción de este tipo en TSI.

Bacilos y Cocobacilos Gram Negativos

(TSI Reacción # 4).

Fondo ácido, superficie ácida, gas variable y H₂S

	E.coli ³	Proteus mirabilis	vulgaris	Citrobacter freundii	Salmonela arizonae ⁴
Ureasa	-	+	+	d	-
Indol	+	-	+	-	-
Motilidad	+ ¹	+ ²	+ ²	+	+
Citrato		d	d	+	+
P D		+	+	-	-
		Rojo de Metilo		+	+
		Voges-Proskauer		-	-
		ONPG		+	+
		L D		-	+

1. Existen cepas no móviles.
2. Crecimiento en oleadas en cajas de agar.
3. Extremadamente raro en ésta categoría (ver reacción #1 en TSI)
4. Extremadamente raro en ésta categoría (ver TSI reacción #2)
Irregularmente y en forma tardía, fermentan la lactosa.

- d. - Diferentes tipos
LD. - Lisina descarboxilasa
PD. - Fenil alanina deaminasa

NOTAS:

- a. La mayoría de las cepas de E. coli y Salmonella son sensibles a la colomicetina, gentamicina, furadantina y polymixina B.
- b. La mayoría de las cepas de Klebsiella son sensibles a la cefalotina, polymixina B y a la gentamicina.
- c. La mayoría de las cepas de E. Coli, Proteus rettgeri y Proteus mirabilis de infecciones del tracto urinario son susceptibles de tratar con altos niveles de penicilina en vivo, por lo que los organismos generalmente parecen ser resistentes a la sensibilidad de prueba en placa.

Bacilos, cocobacilos, filamentos gram negativos

(TSI Reacción # 5)

GRUPO NO ENTERICO

Superficie alcalina, fondo alcalino, no gas y no H₂S.

GRUPO I

	Alcaligenes fecalis	Bordetella bronchiseptica	Pseudomonas ⁴			Brucella ⁵		Moraxella ⁶				Branham-7	Flavo-8	Chromo-10	Acinetobacter
			aeruginosa	fluorescens	malto-philica	canis	spp	bovis	ata	sp	ovis	ella	bacterium	bacterium	bacterium
Ureasa	-	+	+	d	-	+	d	-	-	-	-	-	-	-	d
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-
Motilidad	+	+	+2	+	+	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-
Oxidasa	+	dl	+	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+	-	-
Citrato	d	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	d	d	d	d
Of	ALK	ALK	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0/-9	0/F	0/-	0/-
Hemolisis	-	d	d	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	d	d
		Pigmento	d3	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
			red.Nitratos			+	d	-	+	d	+	d	+	-	-
			Crec.en McConkey			-	d	-	-	d	-	d	d	+	+
			Loeffler digest.					+	+	-	-	-	-	-	-
			Liq. Gelatina(37°C)					+	+	-	-	+	d	d	d

0 - Oxidación
d - diferentes tipos
Alk-alcalina
F- Fermentación

(TSI Reacción # 5)

1. Puede ser débilmente positiva.
2. Existen cepas no móviles.
3. Producen un pigmento soluble que puede ser extraído de un cultivo en caldo con abundante crecimiento (48 horas). Añadir 1 a 2 cc. de cloroformo, agitar bien y observar por la aparición de un color azul-verdoso en la capa del cloroformo.
4. Pseudomonas aeruginosa crecerá a temperatura de 42°C y no a 5°C. Pseudomonas fluorescens crecerá a 5°C y no a 42°C.
5. Debe ser confirmado: serología, patogenicidad, susceptibilidad a fagos, tolerancia a la fucsina y thionina, producción de H₂S, requerimientos de CO₂.
Brucella ovis es un miembro del grupo que es negativo en ureasa, oxidasa y prueba de reducción de nitratos a nitritos.
6. Morfología: diplobacilos y cadenas, gram negativos, pleomórficos o filamentosos.
7. Este organismo semeja a Moraxella bovis. Un importante criterio en el caso de Bramhamella ovis, agente causal de queratoconjuntivitis en borregos, es que la morfología debe ser en forma de coco, dispuestos en pares con los lados adyacentes aplanados.
8. Una temperatura de incubación abajo de 30°C es preferible. En la mayoría de las especies se observa un pigmento no soluble amarillo o café.
9. Algunas cepas pueden ser ligeramente fermentativas.

NOTAS:

- a. Existen ocasiones en que miembros de éste grupo son referidos "como organismos", los cuales son generalmente de significación patogénica dudosa.
10. La mayoría de las especies producen un pigmento violeta insoluble en agua o cloroformo y crecen a 25°C.

1*

	aeruginosa	fluorescens	maltophilia
Crecimiento a 5°C	-	+	-
Crecimiento a 42°C	+	-	-
Pigmentos fluorescentes en luz UV	+ (pyocianina)	+ (fluorescina)	- amarillo*
Maltosa	-	-	+
Manitol	+	+	-
L D	-	-	+

Pseudomonas maltophilia produce pigmento, pero no es fluorescente en luz U.V.

2*	Abortus	melitensis	suis	neotomae	ovis	canis
CO ₂	d	-	-	-	+	-
H ₂ S	+	-	+	+	-	-
Fucsina básica	+	+	-	-	+	-
Tionina	-	-	+	-	+	+

Cocos, Diplococos y Cocobacilos Gram Negativos

GRUPO NO ENTERICO

Superficie alcalina, fondo alcalino, no gas, no H₂S

(TSI Reacción # 5)

GRUPO II

Todos los miembros de este grupo no son móviles, y son indol negativos

Gram negativo Morfología	Neisseria ¹	Branhamella	Moraxella sp.	Acinetobacter
	Cocos simples y en pares	Cocos comunmente en pares	Bacilos gruesos en pares o cadenas cortas, fila - mentos	De cocos a bacilos cortos y gruesos en pares y cadenas filamentos
Catalasa	+	+	d	+
Oxidasa	+	+	+	-
Req. CO ₂	d ²	-	-	-
OF	0/-	-	-	0/-
Pigmento	d	d	-	-
Greco. McConkey	-	-	d	+
Glucosa	d	-	-	d
Nitrato	-	-	d	d
H ₂ S	d	-	-	-
Nitratos	d	+	d	-

1. Se requiere un cuidadoso examen morfológico.

2. N. gonorrhoeae (en especial) y N. meningitidis requiere CO₂ adicional para su aislamiento primario, no crecerán en agar nutritivo, TSI, o agar urea de Christensen, y se encuentran solamente en humanos.

0 - Oxidación

d - diferentes tipos.

Gram Negativos

GRUPO NO ENTERICO

Fondo ácido, superficie ácida, no gas no H₂S

(TSI Reacción # 6)

	Pasteurella			Actinobacillus ⁴				Yersenia ⁶		Serratia ⁷			
	multo cidas	pneumo- tropica	ureae	haemoly tica 5	sp.	sp.	equuli	suis	lignier esii	entero- colitica	Vibrio cholerae	marces cens	liquefaci
oxidasa	+	+	+	+	+	d	d	+	d	-	+	-	-
ureasa	-	+	+	-	-	d	+	+	+	+	-	d	d
indol	+1	+1	-	-	-	-	-	-	-	d	+1	-	-
motilidad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+3	+	+	+
hemólisis	-	-	+	+	-	d	-	+	-	-	d	-	-
ONPG	-2	d	-	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Creca Mc. Conkey	-	-	-	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+
				Rafinosa			+	+	-	-	-	-	d
				Trehalosa			+	+	-	+	+	+	+
				Salicin			d	+	-	-	-	+	+
				Hidrólisis Esculina			-	+	-	-	-	d	d
				Reducción azul de metileno			-	-	+				
									Arabinosa		-	-	+
									Liq. gelatina		+	+	+
									(37°C)				

- 42 -

d - diferentes tipos

(TSI Reacción # 6)

1. Si el indol no es producido en SIM, inocular un tubo de caldo triptosa. En 18 a 48 horas, hacer la prueba de producción de indol, agregando el reactivo de Kovacs.
2. Algunas cepas son positivas.
3. Móviles a temperatura ambiente (22° a 25°C)
4. Cultivos muy pegajosos o adheridos al medio especialmente en aislamiento primario.
5. Inocular cultivos de origen bovino y ovino en trehalosa y arabinosa para la identificación de bio-tipos T (fermentadores de trehalosa) y A (fermentadores de arabinosa).
6. Para diferencia posterior de Yersinia pseudotuberculosis (ver pág. 34).
7. Para pruebas bioquímicas adicionales entre las dos especies (ver pág. 30).

NOTAS:

- a. Muchos de los miembros del grupo Pasteurella - Actinobacillus son clasificados como "spp" y en general son no patógenos y sensibles a la penicilina. No hay una sola característica o conjunto de características para diferenciar el género Pasteurella y Actinobacillus de algún otro.
- b. Miembros del grupo heterogeneo Alkalescens - Dispar (A - D) darán ésta reacción en TSI (ver pág.).

	Hemólisis	Indol	NO ₃ -red	NO ₂ -red	Voges-Proskauer	Ureasa	ONPG (B-gal)	Fenilalanina-desam.	Lisina-descarbox.	Arginina-descarbox.	Ornitina-descarbox.	Catalasa	Gelatinosa	H ₂ S (FeCl ₂ -med.)	KCN	l- Arabinosa	d- Xilosa	l- Rhamonosa	d- Glucosa	d- Galactosa	d- Maltosa	Sucrosa	Lactosa	Maltosa	Celobiosa	Trealosa	Melabiosa	Adonitol	Dulcitol	d- Sorbitol	d- Manitol	Insitol	Salicina	Esculina	Número de cepas examinadas	
<i>P. multocida</i> 1	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	7		
2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	6		
3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	8		
4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	d	-	-	+	-	-	d	+	+	-	-	-	17		
5	-	+	+	-	-	-	d	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	27		
6	-	+	+	-	-	-	-	-	dx	-	d	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8		
<i>P. pneumotropica</i>																																				
Heyl	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	x	+	-	+	+	-	-	-	-	-	x	-	-	17	
Jawetz	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	x	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	
Henriksen	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	x	-	-	-	-	+	+	+	+	x	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	
<i>P. ureae</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	35		
<i>Actinobacillus</i>																																				
<i>lignieresii</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	x	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1	
<i>equuli</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	dx	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	1	
<i>suis</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	1	
<i>P. haemolytica</i>																																				
A	+	-	+	d+	-	-	d	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	d	+	-	-	-	-	-	+	+	x	-	-	-	-	-	
T	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	x	+	+	+	+	+	
B	+	-	+	+	-	-	+	-	-	d	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	x	+	+	+	+	+	
<i>gallinarum</i>	-	-	+	-	-	-	d	-	-	d	+	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ = pos. 1 - 3 días
x = pos. 3 días
- = neg. 30 días

d- = muchas cepas negativas
d = positiva o negativa
0 = reacción débil

Bacilos pleomórficos, cocobacilos y filamentos.

GRAM NEGATIVOS
(TSI SIN CRECIMIENTO)

GRUPO NO ENTERICO.

24 horas. Con frecuencia sin crecimiento o en colonias muy pequeñas en cultivo de gelosa sangre (mejor observación al microscopio de disección), observar por satelitismo a una temperatura de 37°C en CO₂. Reincubar el cultivo.

48 horas. Inocular Triple Azucar Hierro (TSI), y urea.
Sembrar de colonias de gelosa sangre en agar triptosa, incubar a 37°C. con CO₂

72 horas. Si no existe crecimiento en TSI, urea y en las cajas de agar triptosa después de dos días de incubación, sembrar las colonias de gelosa sangre de una forma rectangular en cuatro cuadrantes en una caja de agar triptosa. Con pinzas estériles colocar discos con los factores X, V, y XV en el centro de cada uno de los 3 cuadrantes (el 4º sirve como control), e incubar en CO₂. Observar por crecimiento el rededor del disco (2) y consultar el siguiente cuadro.

Si no existe crecimiento con los discos, una prueba en tubo es hecha. Inocular 4 tubos con caldo triptosa con el microorganismo problema y agregar suplementos X, V, y XV a los tres tubos respectivamente. Un cuarto tubo es utilizado como control sin suplemento.

Observar por turbidez y consultar el siguiente cuadro.

Especies de Haemophilus.

Satelitismo en triptosa	"oakley" "agni"	Haemoglobin ⁷ ophilus	influenzae ¹	parain- ⁴ fluenzae	suís ²	parásuis ⁵	haemolyticus ³	parahemo ⁶ lyticus	gallina rum	paragallina rum
agar con Staph.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Requerimiento de factor X	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
Factor V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	d5	+	d	d	-	-	d	-	-	-
CO ₂	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Hemólisis	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Suero	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+

d - Diferentes tipos

1. Haemophilus "oakley" ("H. somnus". Organismo de la meningo encefalitis en bovinos) y H. "agni" (ovinos) así como Haemophilus - "like spp" pueden crecer en agar triptosa cuando se siembran a partir de gelosa sangre. El procedimiento es subcultivar al organismo en sospecha a otra caja de agar triptosa y observar crecimiento. (Si se sospecha firmemente de Haemophilus pasarlo una tercera vez).
2. Ocasionalmente Haemophilus spp mostrará inhibición alrededor del disco (contiene bacitracina) como ocurre en el caso Haemophilus haemoglobinophilus.
3. Si no existe crecimiento en la caja de triptosa agar, resebrar en agar de suero enriquecido (medio PPLO) o en gelosa sangre. Un organismo que debe ser considerado especialmente de animales salvajes es Francisella tularensis; el aislamiento es oxidasa y catalasa negativo, indentificado por prueba de aglutinación en placa, inmunofluorescencia y posible inoculación en ratones o cuyes.
4. Factor X : 1, u.g. hemina/ml de medio.
Factor V : 1 u.g. NAD/ml de medio (ver pág.
5. H. "oakley" ("H. somnus", "H. somnifer") produce indol "H. agni" no produce indol.

NOTAS:

- a. H. "oakley" o H. "agni" pueden mostrar satelitismo en gelosa sangre, el cual es más intenso en agar triptosa con su apropiado "alimentador" (la mayoría de los Staphylococcus son recomendables).
- b. Haemophilus spp son organismos gastidiosos. Mantener incubados en CO₂ siempre hasta su identificación final. Subcultivarlos por lo menos una vez a la semana.

Grupo no Entérico

Sin crecimiento en TSI

Crecimiento en agar sangre a 37°C. CO₂ (3-15%)
después de 48 horas

Campylobacter

Subespecies	fetus		sputorum			Streptobacillus	
	Jejuni (coli)	fetus	intestinalis	bubulus	sputorum	fecalis	moniliformis
Morfología	Gram negativos, forma de coma, curva o de "S", espirales largas						Bastones delgados en cadenas o filamentos largos irregularmente fragmentados o con forma de hueso (1)
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	-
Catalasa	+	+	+	-	-	+	-
H ₂ S (papel acetato de plomo)	+	-	+ ³	+	+	+	-
TSI	-	-	-	+	+	+	-
Crecimiento en tiol al 1%							
Reducción de Nitratos	-	-	-	+	+	+	-
Requerimientos de CO ₂	+	+	+	+	d	+	+

d - diferentes tipos n.a. - no aplicable

1. La tinción por el método de Giemsa demuestra mejor a este organismo.

2. Inocular en caldo de suero y agar suero (PPLO):

- Observar los crecimientos como "migaja de pan" en el fondo y en las paredes del caldo suero dejando fluido claro.
- Buscar después de 48-72 horas en el agar suero colonias pequeñas, teñirlas con el método de Dienes de acuerdo a la técnica para Mycoplasma.
- Inocular 0.5 cc de caldo de cultivo, intraperitoneal a ratones y observar inflamaciones articulares. Cultivar las articulaciones infectadas para buscar Streptobacillus.

Bacilos Gram Negativos Anaerobios no Formadores de Esporas

		Bacteroides					Fusobacterium			Sphaerophorus ²
		Veillonella	Vibrio melanino spp. genicus	vari- fragilis	obili- nodosus ¹	corro- dens	spp.	fusiformis	spp	nearophorus
Morfología	Cocos	Forma de coma	Células con terminaciones redondas					Células con extre- mos delgados o en forma de perilla		Bacilos largos pleomórficos y filamentos con apariciencia de rosario
		Pigmento	Café negro de 5-7 días	-	-	-	-	-	-	-
		Indol	-	+	-	-	-	+	-	+
		Nitrato Red.	-	-	-	+	d	-	-	-
		Aesculina	+	+	-	?	-	-	d	?
			Hemólisis					+	-	+
			Crecimiento en el fondo del tubo					-	-	+

1. Fusiformes nodosus: Asociado con la pododermatitis ovina es generalmente demostrable en el frotis directo de la lesión.
2. Se puede inocular un cultivo en un conejo por vía subcutanea. Observar por muerte y reacción de necrosis en el sitio o periferia del lugar de inoculación durante un período de 5 días a una semana.

DETERMINACION DE SALMONELLA.

2.1 Generalidades.

Se tomarán muestras a las becerras por medio de hisopos rectales y bucales, los cuales serán obtenidos en el momento en el que la becerra sea muestreada para determinación de Igs.

Los hisopos obtenidos serán introducidos en tubos de ensayo de 150 x 60 con tapón de baquelita conteniendo 10 ml de Caldo Selenite. Los tubos serán enviados al laboratorio.

Los tubos de Caldo Selenite y/o tetratiomato serán proporcionados por el laboratorio al recolector.

Material.

- Tubos con Caldo Selenite y/o tetratiomato inoculados con hisopos tomados a partir de heces y saliva de las becerras.
- Medio de Agar verde brillante^{1/}
- Antisuero Salmonella o poli A-I
- Portaobjetos
- Asa bacteriológica

Método.

Los tubos con Caldo Selenite (medio de enriquecimiento para Salomella) previamente inoculados con los hisopos, se incuban durante 18 hs. a 37°C. Transcurrida la incubación se hará una resiembra a partir de estos tubos, en medio de Agar verde brillante (máximo 4 muestras por placa de Agar), el cual se mantendrá en incubación de 24 a 48 hs. a 37°C. El tiempo de incubación dependerá del crecimiento obtenido a las 24 hs., ya que si éste se considera poco, la caja será reíncubada 24 hs. más.

A continuación se seleccionarán las colonias que presenten las siguientes características:

Crecimiento en colonias aisladas de color rosado, con tamaño entre 1 y 3 mm, transparentes y que hayan cambiado el medio a color rojo (no fermentación de la lactosa).

^{1/} Los medios de cultivo se prepararán de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Las colonias consideradas como sospechosas (de acuerdo a las características anteriormente mencionadas), serán identificadas serológicamente por medio de reacciones de aglutinación, enfrentando la colonia problema con el Antisuero Salmonella o Poli A-I.

Las colonias que produzcan una alutinación de tipo gisoso, en un lapso no mayor de 3 minutos, se considerarán como colonias de Salmonella^{1/}, con lo cual la becerra quedará rechazada.

^{1/} La tipificación de Salmonella se hará a solicitud del clínico responsable de lactación de los recolectores.

GRUPOS DE SALMONELLA.

- GRUPO A : + Salmonella paratyphi A
- GRUPO B : Salmonella schottmulleri
+ Salmonella typhimurium
Salmonella abortus equi
+ Salmonella paratyphi B
+ Salmonella abortus bovis
Salmonella abortus ovis
+ Salmonella chester
+ Salmonella derby
- GRUPO C : Salmonella paratyphi C₁
Salmonella cholerasuis C₁
+ Salmonella montevideo C₁
+ Salmonella newport
Salmonella typhisuis
- GRUPO D : Salmonella typhi
+ Salmonella enteritidis
Salmonella pollorum
Salmonella gallinarum
+ Salmonella dublin

+ Salmonelas de importancia en bovinos.

REFERENCIAS :

Manual de Bergey Ed. 1974

Kauffmann 1966

Van Oye 1964

Kilterborn 1967

Organismos aerobios Gram Positivos 1/

Primeros pasos para su identificación

1. Descripción morfológica
2. Prueba de catalasa
3. Ver tablas en pags.

COCOS CATALASA POSITIVOS	(C)	BACILOS CATALASA POSITIVOS	Ver página
	I.	No ramificados:	
<i>Micrococcus</i> spp.		<i>Bacillus anthracis</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus</i> spp.	
<i>Staphylococcus epidermis</i>		<i>Corynebacterium equi</i>	
<i>Corynebacterium equi</i>		" <i>pseudotuberculosis</i>	
		" <i>renale</i>	
		" spp.	
		" <i>ulcerans</i>	
COCOS CATALASA NEGATIVOS			
<i>Diplococcus pneumoniae</i>		<i>Listeria</i>	
<i>Enterococcus</i> spp. (otros aprte de <i>S. faecalis</i> y <i>S. faecium</i>)		<i>Mycobacterium</i>	
	II.	Ramificados:	
<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>Dermatophilus</i>	
" <i>canis</i>		<i>Mycobacterium</i>	
" <i>dygalactiae</i>		<i>Nocardia</i>	
" <i>equi</i>		<i>Streptomyces</i>	
" <i>equisimilis</i>		<i>Corynebacterium</i> spp.	
" <i>faecalis</i>	(D)	BACILOS CATALASA NEGATIVOS	
" <i>faecium</i>		<i>Actinomyces</i> spp.	
" <i>pyogenes</i>		<i>Corynebacterium pyogenes</i>	
" <i>suis</i>		<i>Corynebacterium haemolyticum</i>	
" <i>uberis</i>		<i>Erysipelothrix</i>	
" <i>zooepidemicus</i>		<i>Lactobacillus</i>	
" <i>viridans</i>			
" <i>zymogenes</i>			
<i>Corynebacterium pyogenes</i>			

1/ Si los organismos se tiñen en forma variable con la coloración de Gram, realizar la prueba KOH. pág.121

Cocos Gram Positivos

(solos - pares - tetradas - racimos)

Staph

	aureus	epidermidis	Micrococcus sp
Catalasa (1)	+	+	+
Coagulasa (2,3)	+	-	-
Of (glucosa) (4)	F	F	0/-

1. Prueba de la catalasa (H_2O_2 -3%)

- Poner una gota de H_2O_2 en un portaobjetos limpio.
- Mezclar el organismo en el H_2O_2 y observar las burbujas.

2. Ejecución de la Coagulasa en placa.

- Poner una gota solución salina en la mitad del portaobjetos.
- Hacer en ella una suspensión con los organismos o probar.
- Agregar una gota de plasma de conejo, observar los grupos; si es negativa hacer la prueba de coagula sa en tubo.
- Hacer un control en la otra mitad de la laminilla como en a) y en b) omitiendo el plasma.

3. Coagulasa en tubo.

- Inocular una asada de cultivo en caldo infusión de cerebro y corazón e incubar toda la noche a $37^\circ C$.
- Agregar 0.5 cc del cultivo a 0.5 cc de plasma, incubar a $37^\circ C$ y observar la coagulación a las 4 horas.
- Si no hay coagulación a las 4 horas incubar el tubo a temperatura ambiente y observar a la mañana siguiente.

4. Medio para oxidación - fermentación.

- Picar dos tubos hasta la mitad aproximadamente.

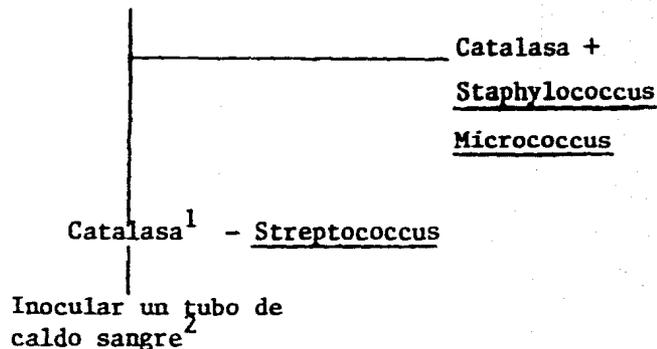
- b) Ponerle a un tubo aproximadamente 1 cc de aceite mineral (fermentación) y dejar el otro expuesto al aire (oxidación).

NOTAS:

- a) Las cepas de Staph aureus han sido susceptibles a cloromicetina, furadantina, cefalotina.
- b) Cubrir uno de los tubos con (vaselina-parafina), glicerina o aceite mineral 1 cc (fermentación). Dejar el otro tubo expuesto al aire (oxidación).
5. Las cepas Staph aureus son susceptibles a cloromicetina, fudadantina, cefalotina, metilicina y gentamicina en el 95 a 100% de los casos.

Cocos Gram Positivos

(Singulares, en pares, cadenas y conglomerados)



Después de 18 a 24 horas, inocular con una pipeta Pasteur estéril, 3 gotas del cultivo de caldo sangre en los diferentes carbohidratos enlistados en el cuadro inferior con excepción de sucrosa y arabinosa 3,4.

	Hemolisina soluble	6.5% NaCl	Lactosa*	Sorbitol*	Trehalosa*	leche tornasolada			Sucrosa	Arabinosa
						R	A	C		
Str. pyogenes	+	-	+5	-	+	-	+	d	+	-
Str. zooepidemicus	+	-	+	+	-	-	+	d	+	-
Str. canis	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Str. equi	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Str. equisimilis	+	-	d5	-	+	-	+	-	+	-
Str. suis ⁷	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
Str. viridans	-	-	d	d	d	+	+	+	+	-
Str. faecalis	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Str. faecium	-	+	+	d	+	+	+	+	d	d
Str. zymogenes	-	+	+	+	+	+	+	+	d	-
Str. pneumoniae ⁶	-	-	+	-	+	-	+	+	+	d
Enterococcus sp	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-

d - diferentes tipos R - reducción A - acidificación

* - contienen suero de caballo C - coagulación

- Colocar una asada del organismo problema en una gota de agua oxigenada al 3% en un portaobjetos limpio observar por burbujas (oxígeno).
- Caldo sangre (caldo triptosa más 3 gotas de sangre de bovino).
 - Beta hemólisis: zona clara alrededor de las colonias; glóbulos rojos lisados.
 - Alfa hemólisis: también llamada hemólisis incompleta, zona verdosa alrededor de las colonias; glóbulos rojos no lisados en caldo.
 - No hemólisis: alrededor de las colonias glóbulos rojos no lisados en el caldo.
- Sucrosa y arabinosa son inoculados al día siguiente si es indicado.
- Cuando se sospecha de Streptococcus hemolítico causantes de mastitis se deberá inocular en los medios de hipurato de sodio y aesculina aparte de los carbohidratos enlistados. Una prueba de CAMP es hecha (inocular en estría la toxina de Staph. B-hemolítico en una caja de gelosa sangre preparada con eritrocitos lavados y sembrar el organismo problema cruzando la estría de la). Cuando se sospecha de Streptococcus agalactiae o Streptococcus uberis se debe observar una amplia zona hemolítica donde la toxina y el organismo cruzan. El cultivo en caldo de hipurato de sodio se incuba por una semana al final de la cual se agregarán 2 ml de solución de FeCl₃ (ver pág.).

	Hemolisina soluble	6.5% NaCl	lactosa	sorbitol	trehalosa	leche Tornasolada	Hidrólisis de hipurato	esculina	Reacción
Str. agalactiae	d	-	+	-	+	RAC	+	-	+
Str. dysgalactiae	-	-	+	-	+	(i)	-	-	-
Str. uberis	-	-	+	+	+	RAC	+	+	d

(i) Coagulación y reducción son variables. d - diferentes tipos.

- Inocular glicerol y utilizar un disco Beta-A (Bacitracina) para los Streptococcus hemolíticos que fermentan la lactosa y trehalosa, inocular en forma rectangular en una caja de gelosa sangre y colocar el disco en el centro del rectángulo. Una zona de inhibición alrededor del disco será sugestivo de ser Str. pyogenes, Str. equisemilis, fermenta el glicerol, Str. pyogenes no.

6. Utilizar un disco de Optoquina (hidroclorhidrato de etilhidrocupreina) cuando se sospecha de D. plococcus pneumoniae, de la misma forma que la técnica usada con el disco de Bacitracina (5) D. pneumoniae es inhibido por la Optoquina.
7. Str. suis fermenta el manitol. Ninguno de los otros Streptococcus B-hemolíticos de los animales lo hace.

NOTAS:

- a) Str. B-hemolíticos son generalmente a la Penicilina. Otros Streptococcus no siempre lo son.
- b) Si una colonia sospechosa de Streptococcus lisa los glóbulos rojos y digiere la leche tornasolada puede tratarse de Corynebacterium pyogenes.
- c) Un método para aislar Strep. hemolíticos de una caja invadida por Proteus consiste en resembrar en medio PEA (Agar Feniletíl Alcohol).

Bacilos Gram Positivos

(Bacilos - pleomórficos - difteroides)

Catalasa Positivos

	Bacillus		Corynebacterium						Listeria 10 monocitogenes	Actinomyces ⁹ viscosus
	anthracis	spp	spp	equi	renale	pseudotuberculosis	kutscheri	ulcerans		
Esporas	+1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidad	-	+2	-	-	-	-	-	-	+	-
Ureasa	-		-	+	+5	+	+	+	-	-
Caldo sangre (hemólisis)			-	-	-	+	-	+	+	-
Glucosa ³	+			-	+6	+	+	+	+	+
Red. Nitratos	+					d8	-	-	-	+
Trehalosa							+	+	+	d
Liq. Gelatina	+						-	+	-	-
									Esculina	+
									H ₂ S(TSI)	+

d - diferentes tipos

1. Bacillus anthracis se encuentra en forma encapsulada en los tejidos o en gelosa sangre de ovino al 7% incubada en 10% de CO₂ y es patógeno para los animales de laboratorio. No es hemolítico y no esporula en el animal huésped.
2. Bacillus cereus var. mycoides y otras variantes no rizoidales no son móviles generalmente. Bacillus spp. son generalmente hemolíticos.
3. La fermentación de los carbohidratos por Corynebacterium son generalmente variables. La identificación genérica en el laboratorio como Corynebacterium es basada principalmente en sus características morfológicas.
4. Corynebacterium equi formar colonias largas y mucoides aparentando "olas" en gelosa sangre. En el medio de Loeffler producen un crecimiento rosado.

5. C. renale muestra signos de hidrolizar la urea generalmente después de 2 horas, en ocasiones después de algunos minutos (5 a 10) de su inoculación. Muchas cepas hidrolizan la caseína en el medio de leche descremada al 10% en agar.
6. Algunas colonias son negativas.
7. Corynebacterium pseudotuberculosis crece característicamente después de 48 horas como colonias hemolíticas blanquizcas y rugosas, las cuales pueden ser desplazadas a lo largo de la superficie del agar en forma intacta. Crepitan a la flama.
8. La reducción de nitratos a nitritos por Corynebacterium pseudotuberculosis se observará en la mayoría de las cepas de origen bovino y equino pero no es así en las de origen ovino y caprino.
9. Actinomyces viscosus es pleomórfico, ocasionalmente filamentoso y ramificado, catalasa positivo, y microaerofílico. Miembro de la familia Actinomycetas originalmente aislados de hamsters se ha encontrado con frecuencia en perros con abscesos (subcutáneos y hepáticos). Se aísla también con frecuencia de la cavidad oral de los humanos. Puede ser confundido con Corynebacterium sp.
10. Cuando son cultivados por el método de la placa vertida (ver en aislamiento pag.). Las colonias de Listeria tendrán una forma como "balón de fútbol americano" rodeadas por una zona de hemólisis. La identificación de Listeria puede ser confirmada con una instilación de una gota de cultivo en caldo en el saco conjuntival de un cuye. Observar por queratoconjuntivitis a partir de las 24 horas después. La movilidad es aumentada si incuban los cultivos a temperatura ambiente 21° a 24°C.

NOTAS:

- a) Algunas bacterias especialmente Actinomyces spp. dan una reacción positiva cuando proceden de gelosa sangre, pero no así cuando proceden del medio sin hemina. Cuando se sospeche de Actinomyces repetir la prueba después de un pase en agar infusión de cerebro y corazón.
- b) C. pyogenes es catalasa (-) miembro del grupo Corynebacterium.
- c) La sensibilidad a los antibióticos no es rutinariamente hecha para Corynebacterium debido a su susceptibilidad a la penicilina. Una excepción es Corynebacterium equi el cual es sensible a la eritromicina, gentamicina, tetraciclinas, sulfas y cloranfenicol.

d) El grupo Bacillus, con excepción de Bacillus anthracis son considerados como sin importancia diagnóstica en la mayoría de los casos. Existen 2 especies de Bacillus de interés en vertebrados: B. cereus relacionado en intoxicaciones por alimento y B. subtilis asociado con infecciones oculares. Sus características bioquímicas son únicas para estos 2 organismos entre todos los Bacillus spp no patógenos y son:

	Anaerobio facultativo	VP	arabinosa	Xilosa	manitol	crecimiento en NaCL al 7%
B.cereus	+	+	-	-	-	+
B.subtilis	-	+	+	+	+	+

Bacilos Gram Positivos

(Pleomórficos, difterioides, irregulares, filamentosos)

Catalasa negativos

18 a 48 horas: Si se sospecha de *Actinomyces*, inocular un tubo de caldo de infusión de corazón (añadir 3 gotas de suero de caballo), también inocular una caja de LBS (*Lactobacillus Selective Agar*), agar almidón y agar infusión de corazón. De otra forma inocular los medios que se enlistan en el cuadro siguiente:

Corynebacterium

	<i>pyogenes</i>	<i>haemoliticum</i>	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Lactobacillus</i>
Licuefacción del Agar suero de Loeffler	+	-	-	sin crecimiento
Caldo sangre hemolisina	+	+	-	-
Color verdosa en Gelosa sangre	-	-	d	d

Si se sospecha de *Actinomyces* después de 24 a 48 horas inocular a partir de caldo infusión de corazón los azúcares con caseitona como base: glucosa, almidón, manitol, manosa, xilosa, rafinosa y nitratol. (Añadir 3 gotas de suero de caballo de cada tubo).

Si se sospecha de *Corynebacterium pyogenes* o *C. haemoliticum*, inocular a partir del caldo sangre glucosa, maltosa, lactosa y leche tornasolada.

	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Lactobacillus</i>
LBS caja	-	+4
Sembrar por pica dura en TSI para H ₂ S	+3	-

1. El grupo *Actinomyces* es variable en relación a la fermentación e hidrólisis del almidón. *Actinomyces bovis* no reduce los nitratos, hidrolisa y fermenta el almidón, y es la única especie reconocida constantemente aislada de animales.
2. *Corynebacterium pyogenes* fermenta regularmente la lactosa y glucosa y en ocasiones la maltosa, además digiere la leche tornasolada. *Corynebacterium haemoliticum* no produce digestión en la leche tornasolada.
3. La confirmación de identificación de *Erysipelothrix* es hecha mediante la protección del ratón.
 - a) Inocular un tubo con caldo triptosa e incubar durante la noche.
 - b) Inyectar 0.50, 0.1 y 0.2 cc., subcutáneamente respectivamente en dos grupos de 3 ratones c/u.
 - c) Inyectar un grupo de ratones con 0.5 cc. de antisuero comercial contra *Erysipela* intraperitoneal - mente en cada uno.
 - d) Observar por muerte de los ratones en un período de 2 a 5 días; los ratones inyectados con el antisuero deben sobrevivir; los ratones inyectados con el cultivo solo deben morir.
4. LBS (*Lactobacillus* selective agar) tiene un pH de 5.5 y algunos *Lactobacillus* tardarán hasta 4 días en formar colonias visibles.

NOTAS:

- a) Algunos *Actinomyces* son estrictamente anaerobios. Algunos son hemolíticos en gelosa sangre.
- b) Existen ciertos organismos que pueden ser identificados "como -*Lactobacillus*" o "como -*Actinomyces*" después de la lectura de las pruebas bioquímicas.
- c) La prueba de sensibilidad a los antibióticos para *Actinomyces* no es recomendable por el método de Kirby-Bauer, generalmente la droga a escoger es la Penicilina.

1
2
1

Bacilos Gram Positivos Anaerobios Formadores de Esporas

Clostridium

	bifer- mentans	haemo- lyticum	botuli num 2	sporo- genes	Sorde llii	tetani ³	capit ovale	histo- lyticum	fallax	chau voei	septi- cum 4	novyi	perfrin gens
Lecitinasa	+	+	-	-	+	-	-	-	?	-	-	+	+
Lipasa	-	-	+	+	-	-	-	-	?	-	-	-	-
Indol	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Ureasa ⁵				+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nitratos red.					-	-	-	-	+	d	+	+
	Glucosa					-	+	-	+	+	+	+	+
						Sucrosa				+	-	-	+
						Leche hierro						sin cambio	S

d - Diferentes tipos
s - Fermentación tormentosa

1. Enfermedad específica en bovinos y ovinos. Ver procedimientos de aislamiento pág.
2. Basada en la demostración de la toxina, se debe realizar la prueba de neutralización de toxina-antitoxina.
3. Esporas redondas en la parte terminal "como bastos de cartas". Los organismos pueden ser muy móviles y pueden crecer en oleadas sobre toda la superficie del agar.
4. Formando cadenas largas de células generalmente de tamaño desigual.
5. El caldo urea (Difco) 31 gr con 100 ml de agua destilada se filtra en un filtro Seitz y se le agrega de 1 a 8 ml de tioglicolato líquido sin glucosa.

Ver bibliografía: Smith Holdman.

Organismos Anaerobios Gram Positivos
No formadores de Esporas

	Peptostreptococcus	Peptococcus	Corynebacterium	Propionibacterium	Actinomyces ¹
Morfología	Usualmente en cadenas largas	Usualmente en pares cadenas o agrupaciones	Pleomórficos, anchos y ovoides, únicos, en pares o conglomerados	Pleomórficos, anchos y ovoides, únicos en pares conglomerados en cadenas cortas	Pleomórficos únicos, en pares conglomerados filamentosos
		Gelatina licuafacc	+	-	-
		Catalasa	d	d	-

d - Diferentes

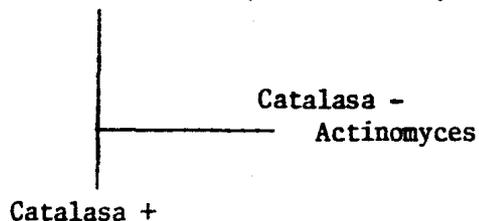
1. Ver identificación de Actinomyces spp. pag.

La identificación es complementada de una mejor forma por cromatografía de los productos de la fermentación de la glucosa.

(Ver Holdeman y Moore).

Bacilos Gram Positivos Filamentosos

(Irregulares, en forma de rosario, ramificados, redondos)



18 horas. Generalmente no es visible el crecimiento en gelosa sangre o saboureaú a 37°C.

48 horas. Hacer tinciones de Gram y Kinyoun para ácido resistentes.

Este grupo en particular es distinto en cultivo y morfología. Observar por las características en el siguiente cuadro.

	Streptomyces	Nocardia	Mycobacterium atípicos	Dermatophilus
Acido resistencia de algunas cepas, colonias gisosas, filamentos ramificados, en forma de rosario no esporulados.	-	+2	-	-
Acido resistencia especialmente de las esporas, colonias opacas, olor rancio, filamentos ramificados, esporas en cadenas.	+1	-	-	-
No ácido resistentes, esporas y filamentos fuertemente teñidas de Gram positivo, colonias café y hemolíticas, ramificaciones muy irregulares, hifas con septo transverso.	-	-	-	+4
Dificultad para demostrar ácido resistencia colonias blancas, filamentosas y menos ramificadas, no esporas y buen crecimiento a temperatura ambiente.	-	-	+3	-

1. El grupo *Streptomyces* se identificará sólo por su apariencia
2. Las especies ácido resistentes de *Nocardia* con interés médico se identifican con los medios que se indican en el siguiente cuadro.

	Digestión de		
	Caseína	Xantina	Tirosina
<i>N. asteroides</i>	-	-	-
<i>N. brasiliensis</i>	+	-	+
<i>N. caviae</i>	-	+	-
<i>Streptomyces</i>	+	+	+

Incubar a temperatura ambiente y observar por una clarificación de la zona alrededor de las colonias de un período de 5 a 14 días.

3. Muchos de los *Mycobacterium* spp. atípicos que crecen en cajas de gelosa sangre están solo Kinyoun ácido resistentes (no alcohol ácido). Estos son generalmente aislados en reptiles.
4. *Dermatophilus* produce digestión del medio de Loeffler y leche tornasolada, causa hemólisis en gelosa sangre. La reacción de los carbohidratos es considerada variable, los nitratos no son reducidos. *Dermatophilus* debe ser considerado cuando el aislamiento problema es originario de una lesión de piel posiblemente relacionada con Streptothricosis.

NOTAS:

- a) La mayoría de los *Streptomyces* no son considerados de importancia patógena. Aparentemente algunos autores los relacionan con los micetomas actinomicóticos. Algunos investigadores los llaman *Nocardia*, algunos otros *Streptomyces*.
- b) La droga escogida generalmente para *Nocardia* han sido las sulfonamidas.
- c) Existen algunas *Nocardias* spp. que son hemolíticas en cajas de gelosa sangre. *N. caviae* puede producir una hemolisina soluble.

IDENTIFICACION DE ALGUNAS LEVADURAS COMUNES

Morfología	Pityrosporum canis	Cryptococcus neoformans sp.		Geotrichum	Trichosporon cutaneum	Candida tropicalis pseudo calis tropicalis spp			
	Ovales o esféricas en gemación única por división horizontal	ovales o esféricas elípticas, gemación única en capsulas con pared gruesa		células rec _u tangulares o en forma de barril, hifas ramificadas	Ovales u oblongas, gemación única mi _{ce} verdadero	ovales elípticas con cuello como de botella, gemación única por gemación ovoide a formación de micelio o pseudomicelio.			
Ureasa	+2	+3	-	+	-	-	-	-	-
Crecimiento 37°C	+	-3	+	+	+	+	+	+	+
Patogenicidad ratón	+4	-	-	-	-	+	-	-	-
Crecimiento en C-C ⁶ en caja	-	-	+	d	+	d	d	d	d
	Presencia de clamidiosporas AHM ⁵ a temperatura ambiente			-	+	-	-	-	-
	Crecimiento de micelios (EMB a 37°C en CO ₂)			+	+	-	-	-	-
	Glucosa			-	AG	AG	AG	d	d
	Maltosa			-	AG	AG	-	d	d
	Sucrosa			-	A/-	AG	-	d	d
	Lactosa			-	-	-	AG	d	d

d - Diferentes tipos

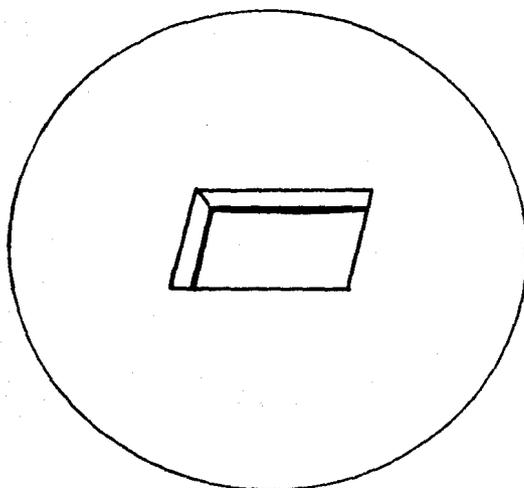
	Microsporium ¹		Trichophyton ³				
	canis	gypseum	mentagrophytes	equinum	verrucosum ⁴	terrestre	rubrum
Principales especies afectadas	perro gato caballo	perro	perro, animales de lab. caballo	caballo	vaca caballo	reptiles	humanos
Superficie de la colonia	sedosa apariciencia algodonosa	empolvada	vellosa o apariciencia algodonosa	esponjosa y aterciopelada	empolvada o vellosa	empolvada granular	esponjosa algodonosa
Base de la colonia	brillante amarilla naranja	amarilla opaca café	bronceada o café	rojiza café o roja	blanca o blanca amari- llenta	amarilla o rojiza	rojo intenso
Macroconidia ⁶	numerosas en forma de uso 2	muy numero- sas, cortas forma de pu- ro 2	raras o abun- dantes en ciertas cepas	raras	raras	numerosas 2	raras
Microconidia ⁶	pocas	pocas o nin- guna	numerosas	pocas o abun- dantes	raras en medio no enriquecido con tiamina	numerosas	comunes de for- ma granular, raras esponjo- sas
Buen creci- miento en:	⁵ Invasión del peli in vitro		+	-	-	+	-
	Aumento de crecimiento a 37°C		-	-	+	-	-
	Medio libre de vitaminas		+				+
	Insitol y tiamina				+		
	Tiamina		+		d		+
	Acido nicotínico			+			

1. Encontrado en perros y gatos como causante de otitis externas y problemas de la piel.
2. Incubar a temperatura ambiente.
3. Puede crecer pobremente a 37°C.
4. Inocular 0.03 cc - 0.04 cc de una suspensión intracerebralmente a un ratón. Revisar hasta por 30 días.
5. AHM - Agar Harina de Maíz.
6. C-C - Agar ciclohexamida y cloranfenicol.

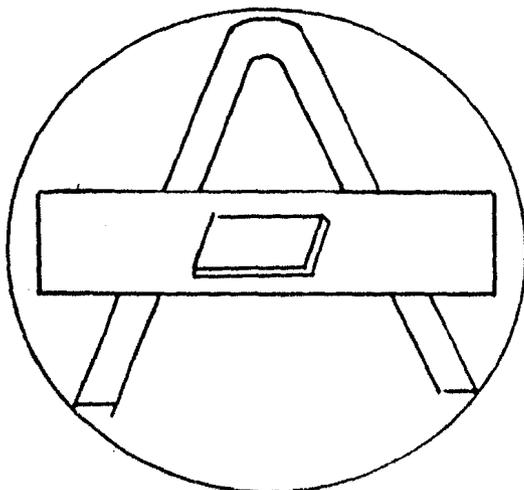
1. Crece de 2 a 4 días.
2. Puede ser observado con un microscopio de disección en cultivos intactos sin abrir en placa.
3. Crecimiento de 4 a 5 días.
4. Forma abundantes Chlamydiosporas en micelio vegetativo.
5.
 - a) Colocar un pelo no pigmentado (cana) de origen humano en una caja de petri estéril con agua.
 - b) Inocular Trichophyton spp. en la preparación de pelo.
 - c) Añadir 5 gotas de extracto de levadura a la preparación.
 - d) Incubar a temperatura ambiente durante un período de 10 a 14 días, y observar con el colorante azul de algodón el pelo afectado en apariencia de perforaciones en forma de cuña.
6. Ver la técnica de cultivo en portaobjetos (en las siguientes páginas: 71, 72).

Para su ilustración y descripción consultar Rebell y Taplin.

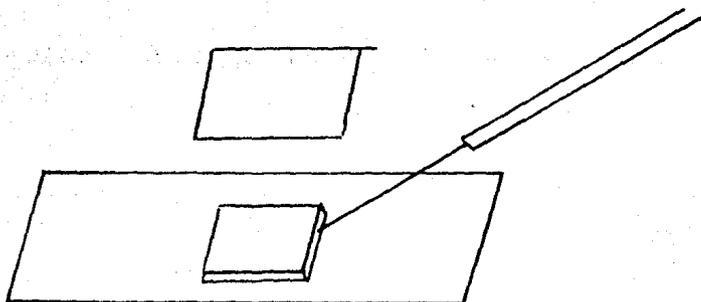
TECNICA PARA EL MICROCULTIVO DE HONGOS EN EL LABORATORIO



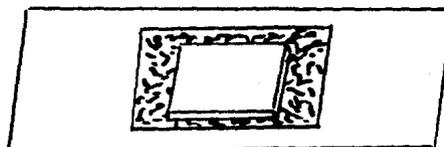
Medio base de Agar Saboureaud
para el microcultivo



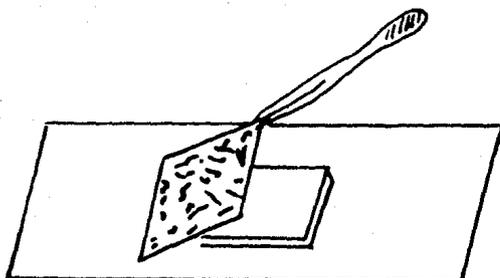
Incubación del microcultivo en una caja de Petri sobre
un tubo de vidrio y agua destilada estéril para evitar
la deshidratación del agar. (8 días)



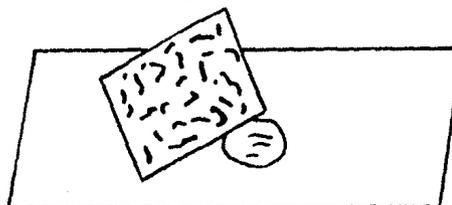
Colocación del bloque de Agar sobre un portaobjetos, siembra de la muestra fungal, colocación del cubreobjetos e incubación.



Crecimiento del hongo



Colocación del cubreobjetos con el crecimiento en sus bordes y cara interna



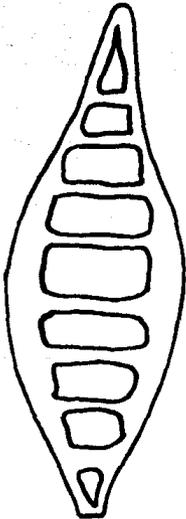
Tinción con el lactofenol azul de algóndon y observación al microscopio.



Diferenciación e identificación de hifas, macro y microconidias, conidiófora esporangiosporas, etc, etc.

MICOLOGIA DIAGNOSTICA

Principales estructuras y formas de presentación de las esporas de los hongos. Acción ectótrica y endótrica



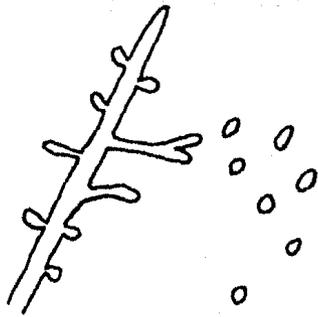
Macroconidia
Microsporium canis



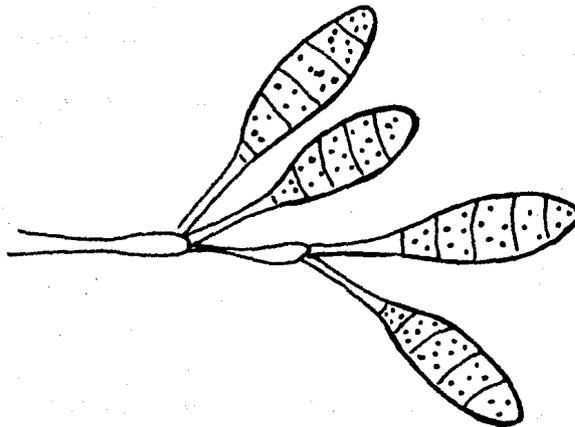
Acción Ectótrica
M. canis



Acción endótrica
Trichophyton tonsurans



Microconidias
T. mentagrophytes

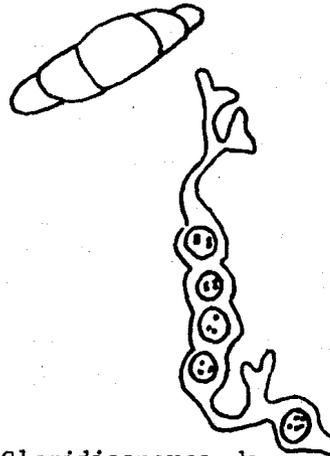


Macroconidias de
Microsporum gypseum

Macroconidia
M. amaznicum



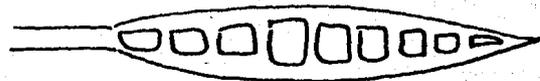
Conidiófora (cuerpo frutal)
conteniendo conidiosporas

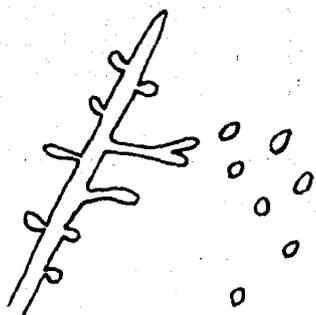


Clamidiosporas de
Trichophyton verrucosum

Aspergillus fumigatus

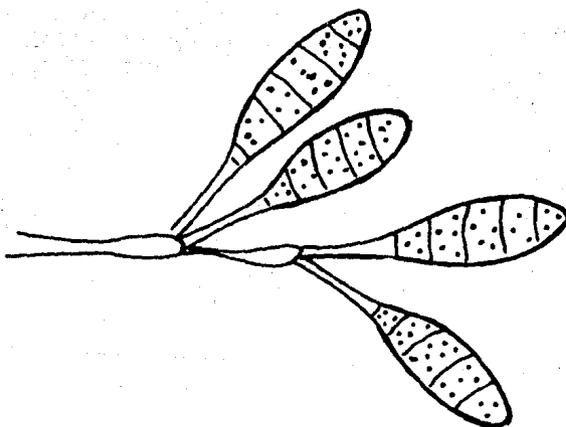
Macroconidia de
T. mentagrophytes



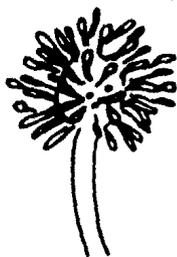


Microconidias
T. mentagrophytes

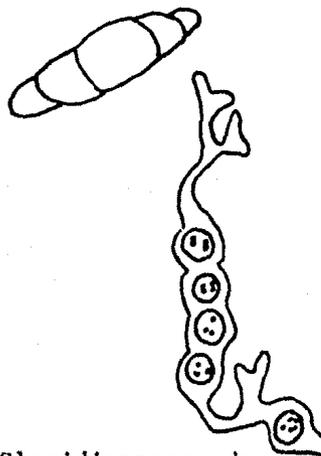
Macroconidias de
Microsporium gypseum



Macroconidia
M. amaznicum



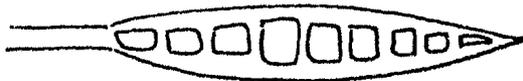
Conidiófora (cuerpo frutal)
conteniendo conidiosporas



Clamidiosporas de
Trichophyton verrucosum

Aspergillus fumigatus

Macroconidia de
T. mentagrophytes



Hongos	Medio	Temp.	Fase de micelio distinguible	Medio	(37°C) Fase de levadura distinguible	Inoculación animal
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Saboureaud Agar infusión de corazón Gelosa san - gre	25°C	2 esporas asexuales 1) Macroconidias tuberculada 12 u diámetro 2) Microconidias esférica 3 u diámetro	Gelosa sangre con y sin glucosa y cistina	Gemación con las células en forma de lágrima u ova-les, con un tama-ño de 2 X 4 micras	Ratón por vía intraperitoneal Muerte en 2 a 4 semanas. 4
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Saboureaud Agar infusión de corazón Gelosa sangre	25°C	Presentación de 1 espora asexual de forma esférica, ovoide o piriforme 12 u diámetro	Gelosa sangre Agar inf. de cere- bro y co razón	Gemación con célu- las únicas, largas y de pared gruesa, de 8 a 15 u diáme- tro	Ratón por vía intraperitoneal Muerte en 4 semanas. 3
<i>Coccidioides immitis</i>	Saboureaud Agar infusión de corazón Gelosa sangre	25°C	Las artrosporas son de pared gruesa, forma de barril de 2 X 10 u diámetro alternándose con células vacías	Pueden pro- ducirse "in vitro", pero no se recomienda para su diagnóstico	Esporangios largos (esférulas) de 20 a 200 u de diámetro conteniendo endospo- ras de 2 a 5 u de diámetro	Ratón por vía intraperitoneal o cuye intrates- ticular. Observar de 2 a 4 semanas.
<i>Sporothrix schenckii</i>	Saboureaud Agar infusión de corazón Gelosa sangre	25°C	2 esporas asexuales 1) Son pigmentadas, nacen en forma única sobre las hifas con un corto estigma. 2) Agrupadas en for- ma de pétalos de mar- garita en la conidio- fora	Agar infu- sión de cerebro y corazón	Gemación con célu- las alargadas en forma de "puro", de 2 X 7 u de diá- metro	Ratón por vía intratesticu- lar. Examinar en 3 semanas. 2

Ver demostración página

1. Hemolítica en caja de gelosa sangre de bovino al 5% después de 4 días.

2. Hacer tinción de Gram.
3. Preparación fresca con KOH 15%
4. Hacer tinción de Giemsa o Wright

MEDIOS EN TUBOS

Todos los medios son incubados a 37°C, salvo excepciones que se señalarán.

1. Triple Azucar Hierro (TSI) Triple Sugar Iron.

SEMBRAR POR PICADURA EN EL FONDO, SEMBRAR SOBRE LA SUPERFICIE EN ESTRIA.

Utilizado para la identificación presuntiva de los microorganismos Gran negativos y como base para pruebas adicionales.

Reacción:	Rojo-naranja - Tubo sin inocular (control)
	Amarillo - Fermentación de glucosa, <u>su</u> (ácido) crosa o lactosa
	Rojo intenso - No fermentación de glucosa, sucrosa o lactosa
	Negro en el fondo - Producción de ácido su Sul- fídrico H ₂ S
	Burbujas de gas en el fon <u>do</u> - Organismo aerobio do del tubo

INTERPRETACION

TSI #	Reacción
1 Fondo ácido Superficie ácida Gas en el fondo Sin color negro	Fermentación de glucosa, sucrosa o lactosa con formación de ácido y gas
2 Fondo ácido Superficie alcalina Variable en gas Color negro en fondo	Fermentación de glucosa, con la <u>for</u> mación de ácido y variable en gas. Sucrosa y lactosa no fermentadas. Producción de H ₂ S.
3 Fondo ácido Superficie alcalina Variable en gas Sin color negro	Fermentación de glucosa con la <u>for</u> mación de gas. Sucrosa y lactosa no fermentadas. No producción de H ₂ S.

TSI #	Reacción
4 Fondo ácido Superficie ácida Variable en gas Color negro	Fermentación de glucosa, sucrosa o lactosa con formación de ácido y variable en gas. Producción de H ₂ S.
5 Fondo alcalino Superficie alcalina No gas Sin color negro	No fermentación de glucosa, sucrosa o lactosa. No producción de gas. No producción de H ₂ S .
6 Fondo ácido Superficie ácida No gas Variable en color negro	Fermentación de glucosa, sucrosa o lactosa con formación solamente de ácido. No gas. Variable en la producción de H ₂ S.

Los tubos con triple azúcar hierro deben de ser examinados a las 24 horas, si se prolonga el período de incubación las reacciones ácidas pueden revertir a alcalinas 1/. La pequeña cantidad de ácido producido de la glucosa es oxidado rápidamente en el tubo el cual puede regresar a alcalino. Cuando existe una tensión baja de oxígeno en el fondo del tubo, la reacción ácida debida a la fermentación de la glucosa es mantenida.

- Ingredientes principales:
- a) Glucosa, lactosa y sucrosa. La concentración de la glucosa es de 1/10 en relación a la lactosa o sucrosa.
 - b) Rojo de fenol como indicador para el pH.
Amarillo - acidez
Rojo - alcalinidad
 - c) Sulfato ferroso, para detectar H₂S.
FeS - precipitado negro.

Referencia: Bailey and Scott, Diagnostic Microbiology, Págs. 14-149

2. Citrato de Simmons, agar.

Sembrar en estría.

1/ Debido a la terminación de los carbohidratos fermentables con el subsecuente ataque de las peptonas a partir de las cuales sustancias alcalinas son producidas (amoníaco, etc.).

Principio: Utilización del citrato por las bacterias como única fuente de carbón.

Prueba: Positivo - azul
Negativo - verde (sin cambio).

Ingredientes principales:

- a) Citrato de sodio
- b) Azul de bromotimol, colorante indicador
Amarillo - ácido
Azul - alcalino
- c) Sulfato de magnesio
- d) Fosfato de monoamínio
- e) Fosfato dipotásico

El metabolismo de los organismos en crecimiento liberan substancias alcalinas produciendo una reacción básica (azul). Los organismos que no crecen no afectan el color del medio.

Referencia: Difco. Pág. 182

3. Urea de Christensen, agar.

Sembrar en estría.

Principio: Determina la habilidad de los microorganismos de hidrolizar la urea con producción de amoníaco.

Prueba: Positivo - rojo
Negativo - amarillo (o sin cambio)

Ingredientes principales:

- a) Rojo de fenol
- b) Glucosa
- c) Urea
- d) Fosfato monopotásico
- e) Peptona

Una molécula de urea es descompuesta en 2 moléculas de amoníaco y una de dióxido de carbono. Esta reacción produce un viraje hacia la alcalinidad produciendo en el medio un color rojo.

Referencia: Difco. Pág. 171

4. SIM (Acido sulhídrico, indol y movilidad)

Sembrar por picadura a la mitad del tubo.

Principio: Es un medio triple para la detección del ácido sulhídrico, producción de indol y movilidad de las bacterias

Prueba: Acido sulhídrico - negro
Indol - color rojo cuando se agrega el reactivo de Kovacs
Movilidad - opacidad del medio
Negativo - color amarillo claro

Ingredientes principales: a) Sulfato ferroso de amonio
b) Tiosulfato de sodio
c) Agar al 0.3%
d) Peptona

La producción de H₂S produce la formación de sulfato de hierro, un precipitado negro. La peptona contiene el triptofano a partir del cual el indol es producido. El agar a tan baja concentración les permite a los organismos móviles el extenderse a través del medio produciendo opacidad en éste.

Referencia: Ver reactivo de Kovacs, págs.

5. Carbohidratos

Cuando se utiliza púrpura de bromocresol son de color azul-rojizo.

Principio: Determinar las características de fermentación de los microorganismos.

Prueba: Positivo - amarillo (ácido)
Negativo - púrpura (sin cambio)
Cámara de aire con el tubo de Durham - producción de gas

Tubo de Durham: Es un tubo pequeño que se coloca en posición invertida en el tubo grande del carbohidrato, que sirve para demostrar la formación de gas a partir de la fermentación del carbohidrato. Para considerarse como positivo se debe desplazar por lo menos 1/4 del volumen total del tubo por la acumulación de gas en la parte superior de éste.

- Ingredientes principales:
- a) Púrpura de bromocresol
 - b) Peptona
 - c) El carbohidrato específico a utilizar como sustrato. (Glucosa, lactosa, sucrosa, etc.).
 - d) En ocasiones se pueden utilizar varios suplementos como: suero, caseitona, extracto de carne, etc.

Referencia: Cowan and Steele, Pág. 108

6. Lisina descarboxilasa (LD)

En caldo, de color púrpura.

Principio: Después de la inoculación, el medio toma un color amarillo debido a la producción de ácido a partir de la glucosa, en caso de que la descarboxilación ocurra el medio vira a un color púrpura debido a la producción de cadaverina y otros productos altamente alcalinos (ami-nas) de la lisina.

Prueba: Positivo - púrpura
Negativo - amarillo

- Ingredientes principales:
- a) L - lisina
 - b) Púrpura de bromocresol
 - c) Peptona
 - d) Extracto de levadura
 - e) Glucosa

Referencia: Suplemento Difco. Pág. 68

NOTA: Existe un medio similar utilizado para la detección de ornitina (actividad de descarboxilación).

7. Fenilalanina deaminasa (PD)

Sembrar en estría.

Principio: La fenilalanina es convertida por desaminación oxidativa en ácido fenil pivúvico, el cual es identificado con la incorporación de cloruro férrico. (Pág.).

Prueba: Positiva - verde (debido a la quelación de Fe +++ con la forma enólica del ácido fenil pirúvico.
Negativo - amarillo.

Ingredientes principales: a) D-L fenilalanina
b) Extracto de levadura
c) Fosfato disódico

Referencia: Suplemento de Difco. Pág. 280
Para las pruebas y reactivos consultar Pág. 79

8. ONPG (O-nitrofenil - B-D-galactopiranosido).

Medio líquido.

Principio: Para la detección de los fermentadores tardíos de la lactosa que hidrolizan el medio de ONPG, el cual es de apariencia incolora y se transforma de color amarillo cuando se forma la D-galactosa y el O-nitrofenol.

Prueba: Positivo - amarillo
Negativo - sin color, transparente

Ingredientes principales: a) Agua de peptona
b) ONPG

Referencia: Cowan and Steele, pág. 122

9. MRVP en caldo. (Rojo de Metilo y Voges Proskauer)

Medio líquido.

Principio: Para la detección de la producción de ácido a partir de la glucosa (MR). Para la formación de acetil-metil carbinol por descarboxilación y condensación del ácido pirúvico (VP).

Prueba: Para el MR - Positivo - rojo (pH de 4.4 o inferior)
Negativo - amarillo (sin cambio, pH 5.3 o mayor)
Para el VP - Color rojo-rodado (color debido a la reacción y condensación entre el producto fi -

nal de la oxidación de la glucosa diacetil) y algunos ingredientes del medio. Esta condensación es incrementada por la alcalinización del cultivo al agregar el reactivo de alfa-naftol.

Positivo - rojo-rosado

Negativo - amarillo (sin cambio)

Ingredientes principales: a) Glucosa
b) Peptona
c) Fosfato diapotásico

Referencia: Difco. Pág. 54

10. Nitrato en caldo

Principio: Demostrar la reducción de nitratos a nitritos.

Prueba: Positivo - rojo
Negativo - amarillo

Ingredientes principales: a) KNO_3
b) Peptona
c) Extracto de carne

Referencia: Difco. Pág. 184
Para reactivos y procedimientos ver Pág.

11. Gelatina nutritiva.

Sembrar por picadura.

Principio: Determinar la licuefacción de la gelatina por la acción proteolítica de las bacterias.

Prueba: Positivo - licuefacción
Negativo - no licuefacción

NOTA: Si la incubación se realiza a una temperatura superior al punto de licuefacción de la gelatina ($23^\circ - 24^\circ\text{C}$), refrigerar los tubos inoculados después de la incubación durante 15' a una temperatura de 4°C . La gelatina licuada, no solidifica a esta temperatura.

Ingredientes principales: a) Gelatina
b) Peptona
c) Extracto de carne

Referencia: Difco. Pág. 32

12. Oxidación / Fermentación. Medio de O/F.

Sembrar por picadura en 2 tubos, cubrir uno de ellos con aceite mineral.

Principio: Determinar si el ataque de las bacterias a un carbohidrato (glucosa), se realiza por oxidación o fermentación.

Prueba: Amarillo en el tubo abierto - oxidación
Amarillo en el tubo cubierto o ambos - fermentación
Verde o azul - no oxidación, no fermentación
(Alcalinidad debido al rompimiento (ataque) de las substancias nitrogenadas y a la liberación de compuestos básicos).

Ingredientes principales: a) Azul de bromotimol
b) Triptona
c) Glucosa (u otro azúcar)

Referencia: Suplemento de Difco. Pág. 255

13. Leche Tornasolada.

Principio: Determinar la acción de las bacterias sobre la leche.
Es un substrato diferencial para las bacterias para detectar: fermentación de la lactosa, acción caseolítica, propiedades de coagulación de la caseína y las actividades de reducción.

Prueba: No reacción - gris-azul
Producción de ácido - rosa
Producción alcalina - azul
Reducción - blanco
Coagulación ácida - coagula rosa, firme
Peptonización o digestión - clarificación del medio con sedimento amorfo en el fondo, caseolisis

Ingredientes principales: a) Leche descremada

b) Tornasol

Referencia: Difco. Pág. 192

14. Loeffler, coagulación del medio más suero.

Medio sólido que se siembra por estría única en el centro.

Principio: Determinación de la producción de pigmento por las bacterias y su habilidad de atacar las proteínas.

Prueba: Pigmento - formación de un color amarillo dorado, rosa, etc.

Digestión o licuefacción - formación de un surco a lo largo de la estría sobre la superficie del medio, con la acumulación de líquido en el fondo de la superficie inclinada del medio.

(Para evitar falsos positivos, remover antes de la inoculación el líquido que exista en el fondo del tubo).

Ingredientes principales:

a) Glucosa

b) Caldo de infusión

c) Suero de caballo

Referencia: Cowan and Steele. Pág. 117
BBL. Pág. 118

15. Thioglicolato de Brewer, caldo.

Principio: Sirve como un medio de enriquecimiento para fluidos, pus, tejidos, etc. Cuando se sospecha de tener anaerobios facultativos, o aerobios.

Prueba: Bacterias aerobias - crecimiento en la parte superior del medio seguido por un rápido enturbiamiento de los tubos.

Bacterias anaerobias - crecimiento cerca del fondo del medio o a alguna distancia considerable de la parte superior.

Ingredientes principales:

- a) L - cistina
- b) Peptona tripticasa
- c) Fitona peptona
- d) Glucosa
- e) 0.1% Agar
- f) Thioglicolato de sodio
- g) Sulfito de sodio

Referencia: BBL. Pág. 145

16. 6.5% Cloruro de Sodio, caldo.

Principio: Utilizado para la identificación de enterococos por su tolerancia al NaCl al 6.5%

Prueba: Crecimiento - color amarillo
Sin crecimiento - púrpura

NOTA: Como los Streptococcus producen ácido a partir de la glucosa, un cambio de color del púrpura al amarillo indica (acidez), crecimiento.

Ingredientes principales:

- a) NaCl (6.5%)
- b) Peptona
- c) Extracto de carne
- d) Glucosa

Referencia: Cowan and Steele. Pág. 98, 123 y 157

17. Triptosa en caldo.

Principio: Medio de uso general en el laboratorio para

- 1) Cultivo de bacterias
- 2) La producción de pigmentos solubles por Pseudomonas
- 3) Producción de indol
- 4) Prueba de suplementos para Haemophilus

Prueba: Extracción de pigmento. Pág.
Producción de indol. Pág.

Para probar requerimientos X o V de Haemophilus, Pág.

Ingredientes principales:

- a) Triptosa
- b) Glucosa
- c) Hidroclorhidrato de tiamina

18. Sangre, caldo.

Principio:

Prueba para detectar la acción hemolítica de las bacterias por una hemólisis (toxina soluble). De gran importancia en la diferenciación de hemólisis alfa de la beta. También para propagación de bacterias fastidiosas en su cultivo.

Prueba:

Hemolisina soluble - los glóbulos en el fondo del tubo liberan/hemoglobina en el medio (sobrenadante) en 24 horas

No hemolisina soluble - los glóbulos rojos no son atacados, no hemoglobina soluble en el sobrenadante.

Ingredientes principales:

- a) Sangre de bovino
- b) Glucosa
- c) Triptosa
- d) NaCl
- e) Hidroclorhidrato de tiamina

Referencia:

Difco. Pág. 102

19. Gillies, medio semisólido para movilidad.

Principio:

Para la detección de movilidad y la producción de indol (es un medio más sensible indicador de movilidad que el de SIM)

Prueba:

Crecimiento - rojo
Motilidad - enturbiamiento del medio, color rojo
No móvil - claro con color rojo en sitio de inoculación

NOTA: Cuando las bacterias se desplazan por el medio el cual es de consistencia semisólida por fenómenos de oxidación que producen una reducción y cambio a color rojo. La detección de indol se hace como de rutina.

Ingredientes principales: a) Triptona
b) Peptona
c) CTT (2,3,5 Cloruro de Trifenil - Te trazolio)
d) Agar al (0.3%)

Referencia: Applied Microbiology: VOL. 16, 1968
Pág. 668

20. Selenito, en caldo.

Principio: Es un medio de enriquecimiento para el aislamiento de los miembros del grupo Salmonella y para la inhibición de las bacterias fecales normales. También permite el crecimiento de Salmonella a partir de un inóculo pequeño. El tiempo de incubación para Salmonella es de 16 a 18 horas a 37°C.

Prueba: Crecimiento - color anaranjado opaco u obscuro
No crecimiento- color anaranjado claro o brillante

Ingredientes principales: a) Triptona
b) Lactosa
c) Fosfato disódico
d) Selenito de Sodio

Referencia: Difco. Pág. 158

21. Esculina.

Principio: Prueba para la identificación de Streptococcus causantes de mastitis, y Bacteroides spp. El glicósido es incorporado a la base nutritiva junto con la sal férrica. Un color café se debe a la reacción del glicósido con el hierro.

Prueba: Hidrólisis - café
No hidrólisis - color azul-verdoso cerca
de la superficie del medio

Ingredientes principales: a) Esculina
b) Citrato férrico
c) Agua peptonada

Referencia: Cowan and Steele, pág. 112

22. Hipurato.

Principio: Prueba para la identificación de Streptococcus causantes de mastitis. El hipurato es hidrolizado a glicina y benzoato de sodio. El cloruro férrico precipita el hipurato y el benzoato, pero el hipurato es más rápidamente soluble en exceso.

Prueba: Hidrólisis - precipitado color café-ro -
sado el cual es soluble en
exceso de reactivo
No hidrólisis - sin precipitado color café
claro

Ingredientes principales: a) Hipurato de Sodio
b) Caldo de infusión

Referencia: Cowan and Steele. Pág. 117
Para la prueba y procedimiento, ver bajo
reactivos en la pág.

23. Thiol al 0.1% y 0.5%

Principio: Medio utilizado para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de Vibrio foetus y Vibrio spp. (Campylobacter).

Prueba: Vibrio foetus - crecimiento en la subsuperficie
Vibrios no patógenos - crecimiento en todo el medio

Ingredientes principales: a) Thiol
b) Agar al 0.1 - 0.5%
c) Acido para amino benzoico
d) Glucosa
e) Proteosa peptona

Referencia: Difco, Pág. 82 a 83

24. Stuart, medio de transporte.

Principio: Utilizado para el transporte y mantenimiento de las muestras clínicas para diagnóstico bacteriológico.
Es un medio nutritivo, semisólido, medio altamente reductor que inhibe la autodestrucción enzimática y previene los efectos letales de la oxidación manteniendo a los microorganismos en las muestras de un estado "quieto".

Prueba: Muy viable - en 24 horas
Menos viable - después de 72 horas

Ingredientes principales:

- a) Thioglicolato de sodio
- b) Glicerofosfato de sodio
- c) Cloruro de calcio
- d) Azul de metileno
- e) Agar

Referencia: Suplemento de Difco, Pág. 414

25. Leche Hierro. Utilizada para aislar Clostridium

Principio: Medio utilizado para observar la producción de H₂S a partir del hierro, principalmente por algunos Clostridium

Prueba

H ₂ S	- negro
Acido	- rosa
Coágulo	- sólido sin retracción
Digestión	- fluido claro con sedimento amorfo
Gas	- orificios en el coágulo
Fermentación	- expulsión del coágulo por tormentosa la producción de gas

Ingredientes principales:

- a) Leche descremada
- b) Hierro

Referencia: Smith. Pathogenic Anaerobic Bacteria,
Pág. 55

26. Fletcher, medio para Leptospira.

- Principio: Se utiliza para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de Leptospira.
- Prueba: Exámenes periódicos al microscopio de campo obscuro para demostrar la presencia de las Leptospiras.
- Ingredientes principales:
- a) Peptosa
 - b) Extracto de carne
 - c) Agar
 - d) Suero de conejo
- Referencia: Suplemento Difco, Pág. 199

27. Stuart, medio para Leptospira.

- Principio: Utilizada para el cultivo de Leptospira, especialmente a utilizar como antígenos en la prueba de aglutinación lisis, ver Pág.
- Prueba: Exámenes periódicos para demostrar la viabilidad en el microscopio de campo obs curo
- Ingredientes principales:
- a) Asparagina
 - b) Cloruro de amonio
 - c) Cloruro de magnesio
 - d) Fosfato de sodio dibásico
 - e) Fosfato de potasio monobásico
 - f) Glicerol
 - g) Suero de conejo
- Referencia: Suplemento de Difco, Pág. 200

28. Infusión de Cerebro y Corazón, caldo.

- Principio: Utilizado para la "semilla" de cultivo en la prueba de Kirby-Bauer de sensibilidad a los antibióticos y para la prueba de coa gula sa en tubo de Staph. aureus.

Prueba: Referirse a la prueba de sensibilidad de antibióticos en las Págs.

Ingredientes principales:

- a) Cerebro de ternera, en infusión
- b) Corazón de bovino, en infusión
- c) Peptona
- d) Fosfato disódico
- e) Glucosa

Referencia: Difco, Pág. 77

29. Carne en trozo con glucosa, medio.

Principio:

Utilizado como medio de rutina para Clostridium spp. Medio excelente para la producción de toxinas por Clostridium, la carne absorbe las enzimas proteolíticas bacterianas que pueden inactivar algunas de las toxinas. Con el tiempo, la carne y la glucosa tienen actividad reductora y decrecen las corrientes de convección en las partículas de carne, de ésta forma se mantienen las condiciones de anaerobiosis.

Ingredientes principales:

- a) Carne de bovino
- b) Peptona
- c) Glucosa

Referencia: Smith, Pathogenic Anaerobic Bacteria, Págs. 55, 195

30. PPLO, caldo con penicilina y acetato de talio.

Principio:

Medio líquido utilizado para el aislamiento selectivo de Mycoplasma a partir de muestras clínicas y para la purificación de las colonias de PPLO contaminadas con otros microorganismos. Se utiliza también para el cultivo y mantenimiento de Mycoplasma.

Ingredientes especiales:

- a) Corazón de bovino en infusión
- b) Peptona
- c) Suero de caballo
- d) Autolisado de levadura
- e) Agregar 5 gotas de Penicilina (1 000 unidades/ml) y acetato de talio al 1:4 000 al caldo PPL0

Referencia:

Difco, Pág. 82
Suplemento de Difco, Pág. 269

31. Trichophyton, agar.

Principio:

Para la identificación de Trichophyton spp., por contener algunos requerimientos nutritivos especiales.

Prueba:

Los tubos con crecimiento abundante son anotados como 4; los otros tubos son leídos por comparación (se debe tener cuidado de no permitir el excesivo crecimiento en los tubos o de no utilizar medios para cultivo primario para las pruebas diferenciales, pues el INOCULO DEBE DE SER PEQUEÑO).

Ingredientes especiales:

- a) Vitamina libre de ácido casamínico
- b) Inositol
- c) Inositol y Tiamina
- d) Tiamina
- e) Acido Nicotínico
- f) Nitrato de amonio, glucosa, sulfato de magnesio, fosfato monopotásico.
- g) Histidina.

Ver Dermotafitos en las págs.

Referencia:

Suplemento de Difco, Págs. 75-76

32. Sangre, cultivo en botella con Thioglicolato al vacío en CO₂.

Principio:

Recomendado para el cultivo de sangre y

otros fluidos del cuerpo (cerebroespinal, pleural, sinovial, etc.) para aerobios y microorganismos anaerobios poco fastidiosos.

Prueba: Positivo - turbidez, cambio de color de la sangre, hemólisis de ésta con burbujas en el caldo. Debe ser subcultivado periódicamente. Ver aislamiento en la Pág. 24

Negativo - sin cambio, después de una incubación prolongada los glóbulos rojos pueden desintegrarse causando la turbidez y cambio de color del medio.

Ingredientes principales:

- a) Medio de Thioglicolato.
Ver Pág.

Referencia: Literatura de Difco.

33. Tubos para el cultivo de Sangre Pre-reducida. (VACUTAINER)

Los tubos de Vacutainer son suplementados con caldo peptona y CO₂.

Principio: Es un método más barato de coleccionar sangre con un dispositivo de salida adicional que permite aumentar el CO₂ en los tubos. Un medio mucho mejor para el cultivo de microorganismos anaerobios conteniendo penicilinas, permitiendo el cultivo de pacientes con tratamiento de Penicilina.

Prueba: (Ver Pág.).

Ingredientes principales:

- a) Peptona
- b) Gelatina
- c) Glucosa
- d) Sulfonato de sodio polianetol
- e) Penicilinas

Se pueden incluir aminoácidos y vitaminas.

Referencia: Becton-Dickinson

34. Petragnani, medio sólido.

Principio:

Recomendado para el uso paralelo con otros medios para el aislamiento de Mycobacterium tuberculosis, en éste medio, el verde malaquita se encuentra en mayores concentraciones que en los otros medios lo cual lo hace más selectivo para Mycobacterium e inhibe más bacterias contaminantes.

Prueba:

Crecimiento de colonias amarillentas típicas de Mycobacterium, en la superficie del medio.

Ingredientes principales:

- a) Almidón de papa
- b) Asparagina
- c) Leche descremada
- d) Huevos completos
- e) Yema de huevo
- f) Glicerina
- g) Papa
- h) Verde malaquita

Referencia:

BBL, Pág. 166
Bailey and Scott, Diagnostic Microbiology, Pág. 299

35. Glicerol, medio sólido.

Principio:

Es un medio que se utiliza para el aislamiento de Mycobacterium tuberculosis.

Prueba:

El glicerol es bacteriostático a concentraciones mayores del 50%. Mycobacterium crece en medios simples con glicerol u otros componentes como única fuente de carbono, principalmente M. tuberculosis.

Ingredientes principales:

- a) Agar infusión de corazón
- b) Glicerol

Referencia:

Cowan and Seteele, Pág. 104.

36. Medio prueba para dermatofitos. (En forma comercial en tubos Pág. 102.

MEDIOS DE CULTIVO EN CAJA

En la siguiente descripción se señalan exclusivamente los medios y constituyentes de éstos que poseen función específica. Los ingredientes se omiten. Ejemplo: cloruro de sodio, agua, etc.

Las cajas con agar son incubadas a una temperatura de 37°C generalmente salvo algunas excepciones.

1. Gelosa sangre.

Es un medio de rutina utilizado para el cultivo y aislamiento de microorganismos patógenos "fastidiosos" para su crecimiento. Detecta además actividad hemolítica de los diversos gérmenes.

Ingredientes principales: a) Sangre de bovino, ovino o equino.

b) Extracto de carne.

c) Triptosa

Referencia: Difco. Pág. 88

2. Triptosa agar.

Es un medio de cultivo general para los microorganismos, sirve como medio de prueba para la prueba de la catalasa y la identificación de Haemophilus.

Ingredientes principales: a) Triptosa

b) Glucosa.

c) Hidroclorhidrato de tiamina

Referencia: Difco. Pág. 111

3. Mac Conkey agar.

Es un medio selectivo para la detección y aislamiento de bacterias entéricas en heces y orina. Es un medio diferencial para la identificación de algunos microorganismos gram negativos no entéricos como: Pasteurella, Yersinia, Actinobacillus.

Los fermentadores de la lactosa forman un color rojo ladrillo (color ácido del rojo neutro).

Los no fermentadores de lactosa - no tienen color.

El color rojo ladrillo es debido a los ácidos que se producen por la

Fermentación de la lactosa, la acción sobre las sales biliares y la subsecuente absorción del rojo neutro.

- Ingredientes principales:
- a) Lactosa
 - b) Sales biliares N^o 3
 - c) Rojo neutro
 - d) Cristal violeta
 - e) Peptona
 - f) Proteosa peptona

Referencia: Difco. Pág. 131
Cowan - Steele. Pág. 106

4. S.S. agar (Salmonella Shigella).

Es un medio selectivo para el cultivo de Salmonella y Shigella a partir de heces fecales u otro material sospechoso de estar contaminado.

Prueba: Los fermentadores de lactosa - producen un color rojo o rosa (color ácido del rojo neutro).
Los no fermentadores de la lactosa - sin color.

Producción de H₂S - medio incoloro con colonias con el centro negro.

- Ingredientes principales:
- a) Lactosa
 - b) Citrato de sodio
 - c) Tiosulfato de sodio
 - d) Citrato férrico
 - e) Verde brillante
 - f) Rojo neutro

Referencia: Difco. Pág. 135

5. V.B. agar. (Verde Brillante).

Es un medio altamente selectivo para el aislamiento de Salmonella especialmente a partir de heces.

Prueba: Los fermentadores de sucrosa o lactosa verde amarillo.
Los no fermentadores - rosa o rojo.
Principio: los microorganismos incapaces de fermentar la lactosa y sucrosa metabolizan los constituyentes de nitrógeno del medio produciendo una reacción alcalina que produce un cambio en el indicador rojo de fenol o rosa o rojo.

Ingredientes principales: a) Lactosa
b) Sucrosa
c) Rojo de fenol
d) Verde brillante
e) Extracto de levadura
f) Peptona No. 3

Referencia: Difco. Pág. 144

6. Levine E.M.B. agar. (Eosina Azul de Metileno).

Es un medio para el aislamiento del grupo coliforme. Un buen medio para la diferenciación de Escherichia coli y para la identificación de Candida albicans.

Prueba: Los fermentadores de lactosa - E. coli producen un color negro en ocasiones con reflejo verde metálico como "lápiz tinta".

Ingredientes principales: a) Lactosa
b) Fosfato dipotásico
c) Eosina
d) Azul de metileno

En incubaciones de 10% de CO₂ Candida albicans produce fase de micelio.

Referencia: Difco. Pág. 35

7. Saboureaud agar.

Recomendado para el aislamiento y propagación de hongos y levaduras. Desde la introducción del medio C - C (# 8), y del agar micofil, ha disminuido un poco su utilización.

Ingredientes principales: a) Neopeptona
b) Glucosa
c) Agar
d) pH 5-6

La neopeptona sirve como una buena fuente de nitrógeno para el desarrollo del hongo, el pH bajo inhibe algunas bacterias.

Referencia: Difco. Pág. 238

8. C - C agar. (Ciclohexamida y Cloranfenicol).

Es un medio selectivo para el aislamiento de hongos patógenos. Recomendado para el aislamiento de Dermatofitos y otros hongos asociados con procesos de infección de piel. Buen medio para el aislamiento de Coccidioides immitis a partir de una área contaminada. No muy conveniente para el aislamiento de Cryptococcus sp. Alescheria boydii y Aspergillus. Para las micosis sistemáticas las muestras deben ser cultivadas en Saboureaud y C-C.

Ingredientes principales: a) Soytona
b) Glucosa
c) Actidiona (ciclohexamida)
d) Cloromicetina

Referencia: Suplemento Difco. Pág. 251

9. Harina de Maíz agar.

Recomendado para la producción de clamidiosporas por Candida albicans y la producción de pigmento y esporas por hongos patógenos.

Ingredientes principales: a) Harina de maíz en infusión
b) Agar

Referencia: Difco. Pág. 246

10. Agar infusión de Cerebro y Corazón

Es un medio de cultivo utilizado para el cultivo de organismos patógenos fastidiosos, y las formas de levadura de Histoplasma capsulatum. Utilizado para la demostración de apariencia de colonias sobre todo Actinomyces spp., también utilizado como medio para la prueba de la catalasa.

Ingredientes principales: a) Infusión de cerebro de ternero
b) Infusión de corazón de ternero.
c) Proteosa peptona
d) Glucosa

Para la fase de levadura de Histoplasma capsulatum, incluir sangre de caballo des fibrada.

Referencia: Difco. Pág. 90 a 91

11. Caseitona almidón agar.

Para la determinación de la hidrólisis del almidón por Actinomyces spp.

Ingredientes principales: a) Caldo infusión de corazón
b) Caseitona
c) Extracto de levadura
d) Almidón soluble

Referencia: CDC (Centro de Control de Diagnóstico) manual de diagnóstico. Pág. G55

Pruebas: Ver reactivos de prueba en la pág.

12. LBS agar (Agar Selectivo para Lactobacillus).

Para el aislamiento e identificación de Lactobacillus

Ingredientes principales: a) Peptona tripticasa
b) Extracto de levadura
c) Glucosa
d) Moneoleato de sorbitol
e) Acetato de sodio hidratado
f) Fosfato monopotásico
g) Sulfato de magnesio
h) Sulfato de manganeso
i) Sulfato ferroso
j) Citrato de amonio
k) pH 5.5

Referencia: BBL, pág. 16

13. Tirosina, Caseína, Xantina agar.

Para la identificación de Nocardia spp. y la separación de Nocardia de Streptomyces spp. por la hidrólisis de la caseína.

Pruebas: Ver en la identificación de Nocardia spp.
Págs.

- Ingredientes principales:
- a) Caseína
 - 1. Leche descremada
 - 2. Agar
 - b) Xantina más
 - 1. Extracto de carne
 - 2. Peptona
 - c) Tirosina más
 - 1. Extracto de carne
 - 2. Peptona

Referencia: Gordon y Mihm, Journal of Bacteriology, 69: 147. 1955.

14. Yema de huevo agar. (Mc Clung).

Se utiliza para la determinación de la reacción de lecitinasa y lipasa producida por Clostridium spp.

- Prueba:
- Lecitinasa - zona de precipitación alrededor de las colonias debido a la acción bacteriana de producción de lecitinasa atacando a la lecitina de la yema de huevo produciendo un diglicerido de fosforil clorina.
 - Lipasa - Formación de una zona de irridisencia "aperlada" sobre y alrededor de las colonias a lo mismo que una zona de opacidad debajo de las colonias debido a la insolubilidad de los ácidos grasos liberados o formados por la lipasa.

- Ingredientes principales:
- a) Proteosa peptona
 - b) Sulfato de magnesio
 - c) Glucosa
 - d) Huevos libres de antibióticos.

Referencia: Smith y Holdeman, Patogenic Anaerobic Bacteria. Pág. 29 - 56, 183 - 184.

15. PPLO agar (Pleuropneumonia like organism), modificada.

Para el aislamiento y cultivo de Micoplasma spp.

Prueba: Ver tinciones, págs. 109 y 110

Ingredientes principales: a) Caldo PPLO sin cristal violeta
b) Autolisado de levadura
c) Suero de caballo
d) Agar

Referencia: BBL. Pág. 128

16. T.P. PPLO agar. (Acetato de Talio - Penicilina).

Recomendada para el aislamiento de Mycoplasma spp. de muestras contaminadas o mezcladas con otros tipos de bacterias.

Prueba: Ver tinciones, págs.

Ingredientes principales: a) PPLO ingredientes # 15, más
1. 5 ml de una solución de acetato de talio al 2.5% (2.5 gr/100 ml de agua destilada) a 500 ml de medio de PPLO
2. 1 000 unidades de penicilina G/ml

Referencia: BBL. Pág. 128

17. Muller - Hinton agar.

Para pruebas de sensibilidad a los antibióticos de los microorganismos.

Prueba: Ver sensibilidad a los antibióticos.
Págs.

Ingredientes principales: a) Infusión de carne
b) Acido casamínico
c) Almidón
d) Agar

Referencia: Suplemento Difco. Pág. 250

18. Cistina Corazón agar.

Recomendado para el cultivo de Francisella tularensis.

Ingredientes principales: a) Infusión de carne de corazón
b) Proteosa peptona
c) Glucosa
d) L - cystina.

Referencia: Difco. Pág. 91

19. Glucosa cistina en gelosa sangre.

Medio utilizado para transferencia de Histoplasma capsulatum en su fase de levadura y para el aislamiento de Francisella tularensis.

Ingredientes principales: a) Extracto de carne
b) Peptona o gelisato pancreático digerible
c) L cisteina
d) Hidróxido de sodio, 5N
e) Eritrocitos
f) Glucosa

Referencia: Blair, J.E. Lennette, E.H. and Truant, J.P.
Manual of Clinical Microbiology, Pág. 651

20. Medio para Dermatofitos. (DTM).

Utilizado para el diagnóstico y aislamiento de Dermatofitos.
Es un medio selectivo que excluye a la mayoría de las bacterias y hongos contaminados, existe un indicador que puede variar a rojo o amarillo que es afectado por los dermatofitos.

Prueba: Dermatofitos: rojo
Saprófitos : amarillo

NOTA: Alrededor de los 4 días los hongos sa
prófitos cambian el medio de amarillo a ver
de rojizo.

Ingredientes principales: a) Fitona
b) Glucosa
c) Sol. de rojo de fenol
d) HCL al 0.8 N
e) Ciclohexamina
f) Sulfato de gentamicina
g) Clortetraciclina

Referencia: Rebell and Taplin, Dermatophytes Their Recognition and Identification. Pág. 106

fermentación de la lactosa, la acción sobre las sales biliares y la subsecuente absorción del rojo neutro.

Ingredientes principales: a) Lactosa
b) Sales biliares No. 3
c) Rojo neutro
d) Cristal violeta
e) Peptona
f) Proteosa peptona

Referencia: Difco. Pág. 131
Cowan - Steele. Pág. 106

4. S.S. agar (Salmonella Shigella).

Es un medio selectivo para el cultivo de Salmonella y Shigella a partir de heces fecales u otro **material sospechoso de estar contaminado.**

Prueba: Los fermentadores de lactosa - producen un color rojo o rosa (color ácido del rojo neutro).
Los no fermentadores de la lactosa - sin color.
Producción de H₂S - medio incoloro con colonias con el centro negro.

Ingredientes principales: a) Lactosa
b) Citrato de sodio
c) Tiosulfato de sodio
d) Citrato férrico
e) Verde brillante
f) Rojo neutro

Referencia: Difco. Pág. 135

5. V.B. agar. (Verde Brillante).

Es un medio altamente selectivo para el aislamiento de Salmonella especialmente a partir de heces.

Prueba: Los fermentadores de sucrosa o lactosa - verde amarillo.
Los no fermentadores - rosa o rojo.
Principio: los microorganismos incapaces de fermentar la lactosa y sucrosa metabolizan los constituyentes de nitrógeno del medio produciendo una reacción alcalina que produce un cambio en el indicador rojo de fenol o rosa o rojo.

TINCIONES

- A. Antes de la tinción, los frotis deben ser secados al aire y fijados suavemente pasándolos por la flama lentamente de 2 a 3 veces.
1. GRAM, modificación de Hucker para tinción de bacterias y levaduras.

Procedimiento:

- a) Cubrir el frotis con cristal violeta por 1 minuto.
 - b) Lavar en agua corriente y añadir lugol durante 1 minuto.
 - c) Lavar y decolorar con alcohol etílico por 5 a 10 segundos.
 - d) Lavar y contrastar con safranina durante 30 segundos.
 - e) Lavar, secar y observar al microscopio.
2. Modificación de la tinción de Hucker.
- a) Cubrir frotis con cristal violeta por 1 minuto.
 - b) Agregar lugol directamente al frotis (sin lavar) por 1 minuto.
 - c) Lavar en agua corriente y decolorar con alcohol acetona.
 - d) Lavar y contrastar con safranina por 3- segundos.
 - e) Lavar, secar y observar al microscopio.

Resultado de la tinción: azul - gram positivo
rojo - gram negativo

Reactivos:

- a) Cristal violeta (1% en solución)
1 gm/100 cc de agua destilada.
- b) Lugol
10 gramos de cristales de yodo
20 gramos de yoduro de potasio
1 000 ml de agua destilada
- c) Decolorantes
- Para Hucker: alcohol etílico al 95%

- Modificación: 2 partes de alcohol etílico al 95% por una parte de acetona.

- d) Safranina (1% en solución)
1 gn/100 cc de agua destilada.

3. Kinyoun, tinción para ácido resistentes principalmente Nocardia 1/
Mycobacterium.

Procedimiento:

- a) Cubrir el frotis con Fucsina fenicada por 3 minutos.
- b) Lavar con agua corriente y decolorar con ácido sulfúrico hasta que el agua corra claramente.
- c) Lavar y contrastar con azul de metileno por 30 segundos.
- d) Lavar, secar y observar al microscopio.

Tinción: rojo - ácido resistente
azul - no ácido resistente

Reactivos:

- a) Fucsina fenicada
Fucsina básica 4.0 grm
Fenol en cristales 8.0 grm
Alcohol (95%) 20.0 ml
Agua destilada 100.0 ml
- b) Decolorantes
Acido sulfúrico sol. acuosa al 1%
- c) Azul de metileno
Azul de metileno 0.3 grm
Agua destilada 100.0 ml

4. Ziehl-Neelsen, tinción para ácido resistentes, principalmente para:
Mycobacterium 1/ y Nocardia

Procedimiento:

- a) Cubrir el frotis con Fucsina fenicada, en placa caliente emitiendo vapores durante 5 minutos, añadir más colorante si es necesario para no dejar secar el frotis.
- b) Lavar y decolorar con alcohol ácido hasta que el colorante rojo se elimine.

1/ Tinción elemental.

c) Lavar en agua y contrastar con azul de metileno de Loeffler durante 30 segundos.

d) Lavar, secar y observar al microscopio.

Tinción: rojo - ácido resistente
azul - no ácido resistente

Reactivos:

- a) Fucsina fenicada
Fucsina básica 0.3 gm
Alcohol etílico al 95% 10.0 ml
Fenol en cristales 5.0 ml
Agua destilada 95.0 ml
- b) Alcohol ácido
Alcohol etílico, 95% 97.0 ml
HCL concentrado 3.0 ml
- c) Azul de metileno de Loeffler
Ver reactivos utilizados para la tinción azul de metileno de Loeffler.

5. Azul de metileno de Loeffler, tinción para demostración de cápsula, ejemplo Corynebacterium.

Procedimiento:

- a) Cubrir el frotis con azul de metileno de Loeffler por 1 minuto.
- b) Lavar con agua corriente.
- c) Secar y observar al microscopio.

Tinción: Azul - gránulos de Corynebacterium
Azul rodeado por un halo - presencia de cápsula.

Reactivos:

- a) Azul de metileno 1.0 gm
Alcohol etílico (95%) 100.0 ml
Solución saturada
Sol al 1% de KOH 1.0 ml
Agua destilada 99.0 ml
Reactivo (a), azul de metileno etílico 30.0 ml

La tinción mejora después de un corto período de tiempo.

6. Macchiavello, tinción para Chlamydia 1/, Rickettsia 1/, Coxiella 1/ y Brucella.

Procedimiento:

- a) Hacer un frotis delgado, secarlo al aire y calen tarlo levemente a la flama.
- b) Agregar fuscina básica por 5 minutos (filtrada por un papel filtro).
- c) Lavar rápidamente en ácido cítrico.
- d) Lavar rápidamente en agua corriente.
- e) Contrastar con azul de metileno durante 5 minutos.
- f) Lavar, secar y observar al microscopio.

Tinción: Rojo - Chlamydias maduras, Rickettsia, Coxiella, Micoplasmas maduros, Brucella spp. y otras bacterias.

Azul - Bacterias y formas inmaduras de Chlamydia y Micoplasma

Reactivos:

- a) Fuscina básica (0.25%)
Disolver 0.25 grm en 100 ml de agua buferada y destilada con un pH de 7.4 y agitar vigorosamente. Dejarla 3 días a temperatura ambiente y después guardarla en el refrigerador.
- b) Acido cítrico en solución acuosa al 0.25%.
- c) Azul de metileno.
Ver reactivos utilizados para la tinción de Kinyoun para ácido resistentes.

7. Wirtz, tinción para esporas.

Procedimiento:

- a) Preparar frotis, secar y fijar.
- b) Cubrir el frotis con verde malaquita en placa caliente hasta la emisión de vapores durante 2 a 3 minutos.
- c) Lavar en agua corriente durante 15 a 30 segundos.

- d) Contrastar con safranina por 30 segundos.
- e) Lavar, secar y observar al microscopio.

Tinción: Verde brillante - esporas
Rojo naranja - el resto del microorganismo.

Reactivos:

- a) Solución # 1
Verde malaquita en sol. acuosa al 5%
- b) Solución # 2
Safranina en sol. acuosa al 5%.

8. Hiss, tinción de cápsula.

Procedimiento:

- a) Preparar frotis y fijar al calor.
- b) Cubrir el frotis con solución # 1.
- c) Calentar por algunos segundos hasta la emisión de vapores.
- d) Lavar en solución # 2.
- e) Secar sin lavar cuidadosamente.

Tinción: cápsulas - pálidos halos color azul cuerpo celular - rojo intenso.

Reactivos:

- a) Solución 1
5 cc de solución alcalina saturada de violeta de genciana y 95 cc de agua destilada.
- b) Solución acuosa de CuSO_4 al 20%
(20 gr / 100 ml de H_2O)

B. PARA LAS SIGUIENTES TINCIONES LOS FROTIS DEBEN SER SECADOS Y FIJADOS CON SOLUCIONES QUIMICAS FIJADORAS.

- 1. Giemsa, tinción para ciertos hongos, levaduras, espiroquetas, Toxoplasma, corpúsculos elementales de Chlamydia y Micoplasma.

Procedimiento:

- a) Fijar el frotis en alcohol metílico por 6 minutos.
- b) Secar al aire.
- c) Teñir con Giemsa por 30 minutos.
- d) Lavar con agua destilada, secar y observar al microscopio.

<u>Tinción:</u>	Azul	- núcleo
	rosa	- eritrocitos
	rosa intenso	- tejido
	violeta o rojo	- Rickettsia, Micoplasma y Chlamydia
	azul pálido	- citoplasma de Toxoplasma
	rojo	- núcleo de Toxoplasma.

Reactivos:

- a) Colorante comercial de Giemsa.
Agregar una gota de colorante de Giemsa a un ml de agua destilada.
- b) Substancia fijadora.
Alcohol metílico anhídrico (reactivo analítico).

2. Klieneberger - Nobel, tinción para Micoplasmas.

Procedimiento:

- a) Preparar un frotis delgado.
- b) Secar al aire y fijar con alcohol metílico o con el medio de Bouin durante 10 minutos.
- c) Lavar cuidadosamente y secar al aire.
- d) Teñir con Giemsa durante 30 a 45 minutos.
- e) Lavar con agua destilada, secar y observar al microscopio.

3. Dienes, tinción para Micoplasmas.

Procedimiento:

- a) Cortar un cuadrado de agar conteniendo las colo -

nias sospechosas de Micoplasma y colocarlo sobre un portaobjetos (el crecimiento debe de estar en la cara superior).

b) Colocar un cubreobjetos conteniendo el colorante de Dienes (deshidratado), sobre la superficie de las colonias.

c) Dejarlo reposar por algunos minutos (3 a 5), y observar al microscopio.

Tinción: azul brillante - Micoplasma
Las colonias densamente pobladas generalmente toman un color rosado en el centro de la colonia con aspecto de "huevo frito".
Las colonias de bacterias se tiñen de azul brillante pero se decoloran después de un corto tiempo.

Reactivos:

- a) Colorante de Dienes..
- | | |
|--------------------|-----------|
| Azul de metileno | 2.50 grs |
| Azure II | 1.25 grs |
| Maltosa | 10.00 grs |
| Carbonato de sodio | 0.25 grs |
| Acido benzóico | 0.20 grs |
| Agua destilada | 100.00 ml |

Utilizando un hisopo con algodón cubrir los cubreobjetos de 22 mm de superficie con una delgada capa de colorante y secarlos. Guardar el cubreobjetos impregnados en una cajade Petri estéril.

4. Wright y Leishman, tinción para demostrar la bipolaridad de Pasteurella spp. y Toxoplasma.

Procedimiento:

a) Preparar un frotis delgado y fijarlo en alcohol metílico durante 5 minutos.

b) Secar al aire y teñir con Wright-Leishman por 3 minutos.

c) Sin lavar, colocar el frotis en solución buffer durante 6 minutos.

d) Lavar el frotis dos veces en agua destilada, secar y observar al microscopio.

6. Tinción Periódica Acida de Schiff (PAS), para la observación de hongos en frotis directos.

Procedimiento:

- a) Preparar el frotis y fijar calentándolo gentilmente a la flama (2 ó 3 veces).
- b) Lavar con agua destilada.
- c) Colocarlo en una solución de (PAS) al 1% por 5 minutos.
- d) Lavar con agua destilada 3 veces.
- e) Colocarlo en una solución reductora de NaHSO_3 en sal acuosa al 2%, durante 3 minutos.
- f) Lavar en agua destilada.
- g) Agragar reactivo de Schiff hasta la aparición de áreas de color rosa (aproximadamente 5 minutos).
- h) Colocarlo en agua corriente durante 15 minutos.
- i) Lavar en agua destilada.
- j) Colocarlo en Hematoxilina de Mayer durante 5 a 10 minutos. Lavar en agua corriente por 5 minutos, y observar al microscopio; si el color es claro, pasar lo de nuevo en la hematoxilina, si al contrario es oscuro, decolorar con alcohol ácido por unos segundos, lavar.
- k) Añadir naranja "G" durante 7 segundos.
- l) Lavar con agua destilada varias veces (3), agregar alcohol etílico rápidamente y clarificar con alcohol al 100%. Sumergirlo en xilol 2 veces y montarlo para su observación.

Tinción: Las estructuras fungales se tiñen de un color rojizo.

Reactivos:

- a) Solución Periódica Acida al 1%.
- b) Reactivo de Schiff.

- c) Solución acuosa al 2% de H_2SO_3
- d) Hematoxilina de Mayer.
- e) Naranja "G".

TINSION DE NEISSER

(Para gránulos metacromáticos o de volutina o corpúsculos de Ballest-Ernst).

I	Azul de metileno	1.0 gr
	95% Etanol	20.0 ml
	Acido acético glacial	50.0 ml
	Agua destilada	950.0 ml

II	Cristal violeta	1.0 gr
	95% Etanol	10.0 ml
	Agua destilada	300.0 ml

III	Crisoidina	2.0 ml
	Agua destilada caliente	300.0 ml

enfriar, filtrar y dejar reposar antes de usarse.

Preparar un frotis como de costrumbre

Teñir por 10 segundos con una mezcla de 2 partes de la solución I y, parte de la solución II

Agitar el colorante soplando suavemente y sin lavar agregar la solución III durante 10 segundos, dejar secar sin lavar.

Resultado: Gránulos - azul
Organismo - café

REACTIVOS DE PRUEBAS

1. Catalasa

Procedimiento: Colocar una asada del cultivo problema, en una gota de agua oxigenada al 3%. (Ver identificación de Staphylococcus y Streptococcus).

Reacción: Positiva - formación de burbujas de gas (O₂).

Reactivos: Solución de peróxido de hidrógeno, reactivo analítico. (30%).

Precaución: es muy caústico.

Preparar una solución acuosa al 3% para la prueba y guardar en refrigeración.

2. Coagulasa

Prueba para la identificación de Staph. aureus.

Procedimiento: Ver bajo la identificación de Staphylococcus.

Reacción: Positiva: prueba en laminilla - coagulación
prueba en tubo

Reactivos: Plasma heparinizada u oxalatado de conejo. (Se puede obtener sangrando un conejo o en forma comercial). Plasma humano desecado en ampollitas (7.5 ml de agua destilada por ampollita). Diagnostic Plasma Warner-Chilcott Normal Range Oxalate Control. (Mantener congelado después de reconstituido).

3. Oxidasa

Procedimiento: Colocar una asada de cultivo en el reactivo de oxidasa (en tubo o impregnado en papel filtro).

Reacción: Positivo - color azul intenso en un lapso de 10 seg.
Negativo - color amarillento o aparición retardada del color azul después de 10 seg.

Reactivos: Tetrametil-p- fenilendiamina dihidroclorhídrica (Eastman Organic Chemicals)
Preparar una solución acuosa al 1%
Guardar en frascos oscuros en el congelador.

Cortar trozos de papel filtro y bañarlos en el reactivo de oxidasa, secarlos y guardar en el refrigerador en una caja de Petri estéril. Prepararlo cada semana, de preferencia diario. El Reactivo puede ser viable hasta por 3 ó 4 días.

4. Rojo de Metilo y Voges Proskauer

Prueba para organismos entéricos.

De un cultivo abundante del organismo problema en el medio de (MRVP) Rojo de Metilo y Voges Proskauer, se parados con una pipeta Pasteur 1 ml de medio por tubo en dos tubos.

Rojo de Metilo:

Procedimiento: Agregar 5 gotas del reactivo de Rojo de Metilo a uno de los tubos con el medio de abundante crecimiento (48 a 72 horas de incubación). Si existe duda repita la prueba 3 ó 4 días después.

Reacción: Positivo - rojo brillante
Negativo - amarillo

Reactivos: Rojo de metilo 0.1 gr
Alcohol etílico (95%) 300 ml

Disolver el colorante en alcohol y agregar agua destilada hasta aforar a 500 ml.

GUARDAR A TEMPERATURA AMBIENTE.

Voges - Proskauer

Procedimiento: Agregar 12 gotas de sol. A de reactivo VP. (alfa-naftol), y 4 ó 5 gotas de hidróxido de Potasio (sol B) al otro de los tubos con el medio. Agitar bien.

Reacción: Positivo - rojo de 5 a 10 minutos
Negativo - café o amarillento

Reactivos: a) Solución A

a-naftol	5 grs
Alcohol etílico absoluto	100 ml

b) Solución B

Hidróxido de Potasio	40 grs
Agua destilada	100 ml

5. Kovacs

Prueba para la detección de indol

Procedimiento: Agregar reactivo de Kovacs a un tubo de SIM inocu lado después de 24-48 horas. Si es posible agregar 0.5 ml. de cloroformo antes del reactivo este favo recerá la extracción del indol y fácil detección por el reactivo.

Esta prueba también se puede hacer en un tubo con caldo triptosa o medio de motilidad de Gilles

Reacción: Positivo - rojo intenso
Negativo - café amarillento

Reactivos:

a) Reactivo de Kovac

Alcohol amílico o isoamílico	150 ml
p-Dietilamino benzaldehido	10 gr
HCL concentrado	50 ml

Disolver el aldehido en el alcohol y añadir el ácido lentamente.

b) Cloroformo, reactivo analítico.

GUARDAR A TEMPERATURA AMBIENTE.

6. Nitratos

Procedimiento: Agregar a un cultivo abundante en caldo nitrato 5 gotas de cada una de las soluciones A Y B.

Reacción: Positivo - rojo
Negativo - amarillo

Si la prueba es negativa, confirmar añadiendo una pequeña cantidad de polvo de zinc al caldo nitrato. Si aparece un color rojo indicará la presencia de nitratos sin reducir, por lo tanto se confirmará como negativa. La ausencia de un color rojo indicará la reducción de nitratos a nitritos a nitrógeno por lo tanto se confirmará como positiva.

Reactivos:

a) Solución A

Acido sulfanílico	8 gr
Acido acético, 5N	1 litro

b) Solución B

Alfa naftilamina	8 gr
Acido acético, 5N	1 litro

El ácido acético 5 normal consiste en una parte ácido acético glacial por 2.5 partes de agua destilada.

GUARDAR EN REFRIGERACION

Precaución: Alfa naftilamina tiene propiedades carcinogénicas.

7. FeCO₃, para determinación Fenilalanina deaminosa

Procedimiento: Colocar 0.2 ml de una solución al 10% de FeCl₃ sobre la superficie del medio par Fenilalanina deaminosa en tubo, de un cultivo incubado 24 horas a 37°C.

Reacción: Positiva - verde
Negativa - amarillo

Reactivos: Sol acuosa de FeCl₃ al 100%

GUARDAR A TEMPERATURA AMBIENTE.

8. FeCl₃, para la determinación de hidrólisis del Hipurato.

Procedimiento: Inocular e incubar el medio de Hipurato de Na durante 4 a 7 días a una temperatura de 37°C. Agregar varias cantidades de FeCl₃ ácido en solución (0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ml) a 1 ml de medio de caldo Hipurato de sodio sin inocular (control).

La última cantidad de FeCl₃ que presente un color amarillo claro, sin precipitado es añadida a 1 ml del sobrenadante del cultivo en caldo. (Cowan an Steele, p. 157-158).

Reacción: Positivo - precipitado abundante de color café o rosado
Negativo - ausencia de precipitado, líquido color café claro.

Reactivos: FeCl₃ 6H₂O 12 gr
HCL concentrado 2.5 ml
Agua destilada 100.0 ml

Diluir el ácido en 75 ml de agua, disolver el cloruro férrico calentando y ajustando volumen con agua.

GUARDAR A TEMPERATURA AMBIENTE.

9. Lugol de Gram, para demostrar la hidrólisis del almidón

Procedimiento: Incubar el medio de agar caseitona almidón inoculado en estría con el cultivo problema durante 24 a 48 horas a 37°C con CO₂. Cubrir la caja con lugol, eliminar el exceso y observar la reacción.

Reacción: Positivo - amplio halo amarillento a los lados de la estría sembrada. (El almidón ha sido hidrolizado).
Negativo - halo de color café o azul oscuro (El almidón no fue hidrolizado).

Reactivos: Lugol de Gram
Ver tinción de Gram pág.

GUARDAR A TEMPERATURA AMBIENTE

10. Cloroformo, para la extracción de pigmento (*Pseudomonas aeruginosa*)

Procedimiento: Agregar de 2 a 3 ml de cloroformo a un cultivo inoculado de caldo triptosa e incubado por 3 a 5 días. Agitar vigorosamente y dejar sedimentar el cloroformo.

Reacción: Positivo - aparición de un color verde amarillento en la capa de cloroformo
Negativo - sin cambio de color en el cloroformo

Reactivos: Cloroformo - reactivo analítico.

GUARDAR A TEMPERATURA AMBIENTE

11. Acetato de plomo, para la detección de H₂S (ácido sulfídico), en cantidades pequeñas.

Procedimiento: Inocular un tubo de caldo triptosa y colocar el reactivo de acetato de plomo sobre la superficie del medio.

Reacción: Positivo - negro
Negativo - blanco

Reactivos: Solución acuosa saturada de acetato de plomo.

GUARDAR A TEMPERATURA AMBIENTE

12. Acido oxálico, para la detección de organismos productores de poca cantidad de indol.

Procedimiento: Similar al método del acetato de plomo.

Reacción: Positivo - rosa
Negativo - blanco

Reactivos: Solución acuosa saturada de ácido oxálico caliente.

Se pueden impregnar tiras de papel filtro y guardar en el refrigerador.

GUARDAR A TEMPERATURA AMBIENTE.

13. Factores W y V, para la identificación de Haemophilus

Procedimiento: Sembrar en estría el medio con el organismo alimentador. (Staph. aureus).

Método del disco: Ver haemophilus spp. Pág. 45

Método en tubo : Inocular 4 tubos de caldo triptosa conteniendo hemina, dinucleótido de niacina y adenina, hemina más DNA y el último como control respectivamente.

Reacción: Positivo - crecimiento alrededor del disco.
Negativo - sin crecimiento alrededor del disco

Reactivos: X - Cristales de hemina: disolver 1 mg/1 ml de trietanolamina; diluir en 100 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración. Utilizar 0.1 ml/ml de caldo triptosa. Guardar la solución en el congelador.

V - (DNA) Dinucleótido de Niacina y Adenina: disolver DNA en agua destilada en una proporción de 1 mg/100 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración. Guardar a -20°C. Utilizar 0.1 ml/ml de caldo triptosa.

Ver páginas

NOTA: Los organismos recién aislados del grupo "como Haemophilus" (*H. somnus*, *H. agni*), no crecen bien en medios con triptosa.

Se requiere un medio nutritivo más los factores suplementarios de crecimiento como son la Hemina y el DNA.

MANTENER LOS REACTIVOS EN CONGELACION.

14. Hidróxido de Potasio KOH al 3%, para la identificación de bacterias Gram Positivas de Gram Negativas sin necesidad de tinción.

- Procedimiento: a) Mezclar una asada de cultivo puro del germen problema en una gota de KOH al 3% en un portaobjetos.
- b) Mezclar bien por movimientos rotacionales y con el asa tratar de ver "elasticidad".
- Reacción: Gram negativas - si la muestra se transforma viscosa o gelatinosa en 5 a 60 segundos. "elástica".
- Gram positivas - no se observa viscosidad
- Reactivos: Solución acuosa de KOH al 3%. (3 gr de KOH en 100 ml de agua destilada).
- Referencia: American Journal of Veterinary Clinical Pathology 1:31 - 35. 1967.

3. Prueba de sensibilidad a los antibióticos.

Requiere una técnica cuantitativa.

1. Los discos de difusión impregnados con antibióticos son de suficiente confianza si se siguen los procedimientos estándares.
2. Bajo condiciones de estandarización, el tamaño de la zona de inhibición alrededor del disco en una medida exacta de la eficacia de la acción antimicrobiana de la droga.
3. Las condiciones de estandarización incluyen: tipo y cantidad de medio, tamaño y concentración del inóculo, temperatura y atmósfera de incubación y concentración de la droga en el disco.
4. Es la evaluación y utilización de los resultados es necesario el conocer la difusibilidad de la droga en el medio así como la posibilidad de alcanzar niveles terapéuticos adecuados en el cuerpo del animal sin peligro de alcanzar niveles tóxicos.
5. El método de KIRBY-BAUER modificado por BARRY que a continuación se describe está diseñada primariamente para bacterias de rápido crecimiento.

3.1 Material.

- (a) Cajas de Petri: de gran tamaño (150 mm diámetro) porque así se pueden acomodar más discos. Si se utilizan las cajas de tamaño estándar (utilizadas para todos los medios de cultivo (100 mm.)), la escala de interpretación debe de reducirse a la mitad.
 - (b) El medio de Agar Muller-Hinton. Reconstituirlo de acuerdo a las indicaciones y verter 70 ml (6 35) dentro de las cajas de petri, las cuales pueden guardarse hasta 4 días en el refrigerador. Sangre puede ser incluida en el agar en caso de que se trate de organismos de lento crecimiento como por ejemplo: Pasteurella, Bordetella, Hemophilus y Streptococcus.
- (3) Los discos de sensibilidad de antibióticos con un contenido específico se puede ver en la tabla.
Observar por la fecha de expiración, guardarlos en refrigeración con excepción de las penicilinas semisintéticas que deben ser mantenidas a baja temperatura (- 20°C)
 - (4) Asas de platino, calibradas en 0.001 ml.
 - (5) Un molde para el depósito de discos. (Difco, BBL, Pfizer), utilizado, pero no de una forma obligatoria. Si no se tiene uno, con un par de pinzas de disección y un recipiente con alcohol se puede trabajar.
 - (6) 10 ml de Agar Muller-Hinton a una temperatura aproximada de 52°C, la cual se puede mantener depositando los tubos de agar en baño maría a esa temperatura.

- (7) 0.05 ml. de caldo de infusión de cerebro y corazón en condiciones estériles en tubos de 13 x 100 mm.

3.2 Procedimiento

- (1) Colectar de 5 a 6 colonias del cultivo problema y colocarlas en un tubo que contenga 0.5 ml. de caldo inf. C y C. (7). El propósito de colectar diferentes colonias es el de evitar al máximo la posibilidad de escoger una colonia mutante con un cuadro no representativo de susceptibilidad.
- (2) Incubar a 37°C por 4 horas.
- (3) Al final del período de incubación colocar las cajas de Agar Muller-Hinton en la estufa por 3 - 5 minutos con el propósito de secar y calentar ligeramente el medio.
- (4) A un tubo con 10 ml de Agar Muller-Hinton líquido a temperatura de 50°C, agregar 0.001 ml (asa de platino) del cultivo inadecuado por 4 horas (1 ml de sangre estéril puede ser añadida en este instante si se requiere), mezclar bien por movimientos rotacionales y rápidamente vertirlo sobre la superficie del medio de Agar Muller-Hinton en caja. Tenga la seguridad de que toda la superficie de la caja haya quedado cubierta con el cultivo.

ESTA ETAPA REQUIERE RAPIDEZ PUESTO QUE EL AGAR PUEDE SOLIDIFICAR DURANTE EL PROCESO

- (5) Permitir la solidificación del cultivo durante 5 a 10 minutos y a continuación coloque los discos a iguales intervalos de distancia. Las cajas grandes permiten hasta 12 discos sin zonas superpuestas de inhibición. Discos extras pueden ser colocados en el centro del medio. Los discos deben de ser presionados con pinzas para asegurarse de su buen contacto con el agar.
- (6) Incubar durante un período de 18 horas (no es necesario CO₂ para el crecimiento de los microorganismos a menos de que éstos lo requieran así. Para efectuar la medida exacta de las zonas de inhibición se utiliza una regla o calibrador. Interpretar la sensibilidad en la tabla de la

NOTAS:

1. El crecimiento en oleadas de Proteus sobre la zona de inhibición puede ser ignorada.
2. La presencia de sangre en el agar neutraliza la acción de las sulfonamidas

3. Las sulfonamidas efectivas no suprimen el crecimiento de una forma instantánea. Las áreas de disminución de crecimiento dentro de la zona de inhibición son descartadas en la medición.

3.1.3 Ventajas del procedimiento

1. Método repetible de medición de susceptibilidad in vitro
2. Relacionado con las concentraciones posibles de alcanzar en los fluidos del cuerpo.
3. Fácil de realizar con un mínimo equipo y tiempo.

3.1.4 Limitaciones y desventajas de las pruebas de sensibilidad

1. No es útil para bacterias de crecimiento lento y anaerobias.
2. Tiene todas las limitaciones de las pruebas in vitro: no toma en cuenta la actividad bajo diferentes tipos de pH, metabolitos corporales, presencia de enzimas, estructuras de obstáculos como por ejemplo: lesión vascular, necrosis, fibrosis, etc.
3. Necesita de una estandarización rigurosa, incluyendo pruebas periódicas (semanales), de control de microorganismos. (Staph. aureus y E. coli)
4. Corto período de vida del (Inóculo) vertido en el medio.

TABLA DE INTERPRETACION DE LA ZONA DE INHIBICION POR EL METODO DE KIRBY - BAUER

Agentes quimioterapéuticos	Potencia del Disco	Diámetro de la zona de inhibición en milímetros			
		Resistente	Intermedio	Sensible	
Bacitracina	10 U	8 menos	9-12	12 más	
Cefaloridina	30 ug	11 menos	12-15	16 más	
Cefalotina	30 ug	14 menos	15-17	18 más	
Cloranfenicol	30 ug	12 menos	13-17	18 más	
Colistina	10 ug	8 menos	9-10	11 más	
Eritromicina	15 ug	13 menos	14-17	18 más	
Gentamicina	10 ug	-	-	13 más	
Kanamicina	30 ug	13 menos	14-17	18 más	
Lincomicina	2 ug	9 menos	10-14	15 más	
Meticilina	5 ug	9 menos	10-13	14 más	
Nafcilina y Oxacilina	1 ug	10 menos	11-12	13 más	
Acido nalidixico	30 ug	13 menos	14-18	19 más	
Neomicina	30 ug	12 menos	13-16	17 más	
Novobiocina	30 ug	17 menos	18-21	22 más	
Nitrofurantoina	300 ug	14 menos	15-16	17 más	
Oleandomicina	15 ug	11 menos	12-16	17 más	
Polimixina-B	300 U	8 menos	9-11	12 más	
Estreptomicina	10 ug	11 menos	12-14	15 más	
Sulfonamidas	300 ug	12 menos	13-16	17 más	
Tetraciclina	30 ug	14 menos	15-18	19 más	
Vancomicina	30 ug	9 menos	10-11	12 más	
Ampicilina	Gram-negativos y Enterococcus	10 ug	11 o menos	12-13	14 o más
	Staphylococcus y organismos sensibles a la penicilina	10 ug	20 o menos	21-28	29 o más
	Haemophilus	-	-	-	20 o más
Penicilina G	Staphylococcus	10 U	20 o menos	21-28	29 o más
	Otros microorganismos	10 U	11 o menos	12-21	22 o más

Ryan, J.K. Schoenknecht, F.D.
Kirby, W.M.M. Disc. Sensitivity Testing. Hospital Practice. pp. 91-100 (February 1970) +

ANTIBIOTICOS- PROBADOS EN VARIOS GRUPOS DE BACTERIAS

<u>Antibiótico</u>	<u>Staph.</u>	<u>B- Strep.</u>	<u>a- Strep.</u>	<u>Enterococcus</u>	<u>Msc. Gm.+</u>	<u>Entéricos</u>	<u>Pseudo monas</u>	<u>Msc. Gm.-</u>
Penicilina <u>1/</u>	+	+	+	+	+	-	-	+
Ampicilina <u>2/</u>	-	-	+	+	+	+	-	+
Meticilina <u>3/</u>	+	-	+	+	-	-	-	+
Cloranfenicol <u>1/</u>	+	+	+	+	+	+	-	+
Tetraciclina <u>1/</u>	+	+	+	+	+	+	-	+
Cefalotina <u>3/</u>	+	-	+	+	+	+	-	+
Eritromicina <u>3/</u>	+	+	+	+	+	-	-	-
Estreptomicina <u>1/</u>	+	-	+	+	+	+	-	+
Neomicina <u>1/</u>	+	+	+	+	+	+	-	+
Lincomicina <u>3/</u>	+	-	-	-	-	-	-	-
Kanamicina	+	-	+	+	-	+	-	+
Vancomicina		-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina <u>1/</u>	+	-	-	-	+	+	+	+
Sulfas <u>2/</u>	-	-	-	-	-	-	-	-
Furadantina <u>1/</u>	+	-	+	+	+	+	-	+
Polimixina B <u>2/</u>	-	-	-	-	-	+	+	+
Carbenicilina	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacitracina	-		-	-	-	-	-	-

Mayormente utilizados

- raramente utilizados

1/ Discos de rutina utilizados para organismos Gram positivos y negativos

2/ Discos de rutina adicionales incluidos para organismos Gram negativos

3/ Discos de rutina adicionales incluidos para organismos Gram positivos

- a) Estándares tentativos.
- b) Solo en infecciones del tracto urinario.
- c) No se utiliza en medios que contengan sangre.
- d) Cualquiera de los discos de sulfonamidas viables comercialmente de 250 ug a 300 ug pueden ser utilizados con los mismos estándares de esta tabla.
- e) Esta categoría incluye algunos organismos como los Enterococcus que pueden causar infecciones sistemáticas, tratables con altas dosis de penicilina-G

BACTERIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

Sustituto de leche, ensilado, concentrado, melaza, forraje fresco y achicalado. Se mencionarán una técnica cualitativa y una cuantitativa para determinar la presencia de contaminación bacteriana en los alimentos.

La técnica cualitativa servirá para determinar fundamentalmente la presencia de coliformes (contaminación fecal) en el concentrado y el sustituto, por ser utilizado en la alimentación de becerras menores de 35 días de edad en las cuales pueden llegar a causar problemas de diarrea.

La técnica cuantitativa proporcionará el número de colonias por ml. de alimento. Aunque a este respecto no existe un dato preciso en cuanto a la cantidad de colonias permitidas o que se consideran que no causan problema, como en el caso de la legislación para determinar si una agua es potable o no lo es.

TOMA DE LAS MUESTRAS.

La toma de las muestras se hará a diferentes niveles de los sacos de sustituto, concentrado y del ensilaje y otros, con el objeto de obtener una muestra representativa. En el caso del ensilaje se tomarán aproximadamente 500 gr. de cada uno de los niveles (fondo, parte media y superficie), las muestras serán colectadas en bolsas de plástico limpias.

En el caso de sustituto y del concentrado la muestra tomada será de aproximadamente 100 gr. por nivel. Las muestras serán depositadas en frascos estériles o en su defecto perfectamente limpios y secos.

ANALISIS CUANTITATIVO.

Material.

5 tubos de 150 x 15 con tapón de baquelita con 9 ml cada una de solución salina fisiológica o agua bidestilada estériles por muestra.

1 tubo aforado a 10 ml estéril por muestra.

Cajas de Gelosa sangre.

Pipeta Ependroff calibrada a 0.02 ml.

Pipetas estériles de 1 ml.

Cánulas para pipeta Ependroff estériles.

Se deposita un gramo de la muestra problema en un tubo aforado a 10 ml. estéril aforando con agua bidestilada estéril o solución salina fisiológica, obteniendo una dilución de 10^{-1} , a partir de este tubo se harán diluciones decuples utilizando los 5 tubos con 9 ml de solución salina fisiológica o agua bidestilada estéril, hasta llegar a una dilución de 10^{-6} , a continuación se siembran medias cajas de gelosa sangre (una mitad para cada dilución) con la pipeta Ependroff calibrada a 0.02 ml con cada una de las diluciones obtenidas, depositando 4 gotas de 0.02 ml en cada media caja. Se meten a incubar durante 24 horas a 37°C .

El cálculo del número total de colonias por mililitro de muestra se efectúa de la siguiente manera:

- Se selecciona la siembra de la dilución en la cual las colonias son contables con facilidad (partiendo de 10^{-1} a 10^{-6}). Se suman el número de colonias contadas en las cuatro gotas y se divide entre cuatro, con el fin de obtener el promedio por gota. Este promedio se multiplica por 50 para obtener la cantidad en un mililitro y la cantidad obtenida se multiplica por la dilución en la cual se realizó el conteo, teniendo como resultado la cifra real del número de colonias por ml de muestra.

Ejemplo: Después de haber sembrado las medias cajas de gelosa sangre y de haber incubado las cajas por 24 horas a 37°C se observa el crecimiento obtenido y se encuentra que en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} las colonias son fácilmente contables, pero en la dilución 10^{-5} si lo son, obteniendo

do una cuenta de 5, 3, 6, 9 en las gotas, entonces se efectuan las siguientes operaciones:

Se suman las colonias obtenidas en las 4 gotas y se dividen entre 4,10 que nos da el promedio en 0.02 ml, para obtener la cantidad en un mililitro es necesario multiplicarlo por 50 y por la dilución en la que se efectuó el conteo, que en este caso es de 10 000.

$$\text{Número total de colonias} = \frac{5+3+6+9}{4} = 5.75 \times 50 = 287.5 \times 10\ 000 =$$

2,875,000.00 por ml. 6 gm.
=====

ANALISIS CUALITATIVO.

Material.

Tubo con la dilución 10^{-1} del análisis cuantitativo.

Cajas de medio selectivo para enterobacterias (Mc. Conkey, EMB, ENDO) una caja de cualquiera de los tres por muestra.

Tubos de Agar Verde Brillante., una por muestra.

Pipetas de un mililitro estériles.

Se toma un mililitro de la dilución 10^{-1} con una pipeta estéril y se deposita en el tubo que contiene 9 ml. de caldo selenite o caldo terationato, se incuba durante 18 horas a 37° C., (cultivo o siembra primaria), para ser resembrado después de este tiempo en una caja de agar Verde Brillante, la cual se incuba 24 hrs a 37° c. Este cultivo es para determinar fundamentalmente la presencia de Salmonella, por lo cual, las colonias obtenidas en este cultivo se trabajan en forma de cultivo tipo para llegar a determinar el género y la especie de estas.

Para la determinación de coliformes en general, se toma una sada de la muestra de la dilución 10^{-1} y se siembra en la caja de medio selectivo para coliformes seleccionada. Se incuba durante 24 horas a 37°C., después de este tiempo se sugiere la rutina indicada para la tipificación de las bacterias de acuerdo -

una cuenta de 5, 3, 6, 9 en las gotas, entonces se efectúan las siguientes operaciones:

Se suman las colonias obtenidas en las 4 gotas y se dividen entre 4,10 que nos da el promedio en 0.02 ml, para obtener la cantidad en un mililitro es necesario multiplicarlo por 50 y por la dilución en la que se efectuó el conteo, que en este caso es de 10,000.

$$\text{Número total de colonias} = 5+3+6+9 = \frac{23}{4} = 5.75 \times 50 = 287.5 \times 10,000 =$$

ANALISIS CUALITATIVO.

Material.

Tubo con la dilución 10^{-1} del análisis cuantitativo.

Cajas de medio selectivo para enterobacterias (Mc. Conkey, EMB, ENDO) una caja de cualquiera de los tres por muestra.

Tubos de Agar Verde Brillante, una por muestra.

Pipetas de un mililitro estériles.

Se toma un mililitro de la dilución 10^{-1} con una pipeta estéril y se deposita en el tubo que contiene 9 ml. de caldo selenite o caldo terationato, se incuba durante 18 horas a 37°C , (cultivo o siembra primaria), para ser resembrado después de este tiempo en una caja de Agar Verde Brillante, la cual se incuba 24 hs. a 37°C . Este cultivo es para determinar fundamentalmente la presencia de Salmonella, por lo cual, las colonias obtenidas en este cultivo se trabajan en forma de cultivo tipo para llegar a determinar el género y la especie de éstas.

Para la determinación de coliformes en general se toma una asada de la muestra de la dilución 10^{-1} y se siembra en la caja de medio selectivo para coliformes seleccionada. Se incuba durante 24 horas a 37°C , después de este tiempo se

sugiere la rutina indicada para la tipificación de las bacterias de acuerdo a sus características de tensión utilizando para ello las tablas de referencia diagnóstica.

ANALISIS BACTERIOLOGICO DEL AGUA.

Objetivo : Revisar la potabilidad del agua, desde el punto de vista sanitario.

Requisitos de la S.S.A. para conciderar potable el agua:

- no contener más de 20 coliformes por litro.
- no contener más de 200 colonias por ml.
- estar libre de bacterias que produzcan mal olor, pigmento y licuefacción de la gelatina.

Se realiza un análisis cualitativo y un cuantitativo.

El análisis cualitativo consta de 3 fases:

a). Prueba Presuntiva.

Material:

5 tubos de ensaye con 10 ml. de Caldo Lactosado a concentración doble, con tubo de Durham.

1 pipeta de 10 ml. ésteril

Se inocula cada uno de los tubos de caldo lactosado a concentración doble con 10 ml. de la muestra.

Se incuba a 37°C. durante 24 horas.

Lectura: turbidez del medio y presencia de burbújas de gas en el tubo de durham sugieren el crecimiento de coliformes.

No. aproximado de coliformes por litro, de acuerdo al número de tubos en los que haya habido turbidez y producción de gas:

- 1 tubo	20 coliformes/litro		
- 2 tubos	50	"	"
- 3 tubos	90	"	"
- 4 tubos	160	"	"
- 5 tubos	+160	"	"

b). Prueba Confirmativa.

Material:

Medios de cultivo diferenciales y selectivos para Enterobacterias.
(Mac. Conkey, ENDO, EMB, Agar Verde Brillante)

asa bacteriológica

Se siembra con el asa una caja de uno de los medios mencionados anteriormente ,
a partir del tubo de caldo lactosado de la prueba anterior, en el cual haya ha-
bido la mayor producción de gas.

Se incuba la caja, de agar a 37°C. durante 24 horas.

Lectura: crecimiento de colonias características. Tinción de Gram para observa-
ción de bacilos Gram (-). Aseveración de que hay coliformas.

c). Prueba Completa.

Material:

Tubo de ensaye con 10 ml. de caldo lactosado a concentración sencilla
asa bacteriológica

Se inocula el tubo de caldo lactosado con una colonia de las obtenidas a partir
de la prueba confirmativa.

Se incuba a 37°C. durante 24 horas.

Lectura: turbidez del medio y producción de gas. El agua presenta contaminación
con materias fecales.

Prueba de la Gelatina.

Material:

1 caja de petri esteril

1 pipeta de 1 ml. esteril

15 a 20 ml. de gelatina licuada (45°C.)

Se deposita en la caja esteril 1 ml de la muestra, se adicionan de 15a 20 ml. de
gelatina licuada (45°C) y se mezcla con movimientos suaves, para formar una mez-
cla homogénea con el agua.

Se incuba a 37°C. durante 24 horas.

Lectura: transcurridas las 24 horas de incubación, se mete al refrigerador durante 10 minutos, se retira y se determina si solidifico. Si no hay solidificación posee germen que licua la gelatina.

Por medio del olfato se determina si hay mal olor. Se observa si hay producción de pigmentos (coloraciones) en la gelatina.

Análisis Cuantitativo,

Objetivo : determinar la cantidad de colonias por mililitro de muestra.

Material:

Caja de Petri esteril

1 pipeta de 1 ml. esteril

15 a 20 ml. de Agar Tripticasa Soya licuado (45°C)

Se deposita en la caja esteril 1 ml. de la muestra, se adicionan de 15 a 20 ml. de agar Tripticasa soya licuado y se mezcla con movimientos rotatorios suaves para homogenizar la muestra con el agar.

Se incuba a 37°C durante 24 horas.

Lectura: Cuantificación de las colonias presentes en el agar.

IV. PARASITOLOGIA.

I N T R O D U C C I O N .

La presentación y frecuencia de las enfermedades parasitarias varia notablemente de una región a otra, esto dependiendo de la importancia relativa de muchos factores como son: el microclima y macroclima del medio, volúmen y altura de los pastos, hábitos de pastoreo, estado nutricional e inmunológico del huésped, la presencia de vectores y/o huéspedes intermediarios, el número de huevecillos y larvas infectantes en el medio. (15, 20, 37)

Las parasitosis de acuerdo a su localización en el huésped definitivo se clasifican en :

a). Parasitosis Internas o Endoparasitosis.

En estas los parásitos se van a encontrar habitando los diferentes órganos y sistemas del huésped afectado. Ejemplo: Fasciola hepatica en hígado, Moniezia expansa en intestino, Anaplasma marginale en sangre, etc.

b). Parasitosis Externas o Ectoparasitosis.

Son aquellas en las cuales los parásitos se van a localizar en la superficie externa del huésped, como son : la piel, pelo y tejido subcutáneo. Ejemplo: garrapatas, piojos, ácaros, larvas de mosca etc. (7, 15, 20)

a). PARASITOSIS INTERNAS o ENDOPARASITOSIS.

PARASITOS SANGUINEOS.

Las enfermedades causadas por hemoparásitos generalmente se caracterizan por fiebre, la cual puede ser persistente o recurrente, debilidad, adelgazamiento e ictericia, hemoglobinemia y/o hemoglobinuria, causando un síndrome anémico. Lo anterior no significa que todas las enfermedades causadas por hemoparásitos presenten estos signos, sino que estos varían de acuerdo al agente causal, inclusive será necesario establecer un diagnóstico diferencial con otras enfermedades, generalmente de tipo bacteriano.

En bovinos los hemoparásitos que se encuentran con más frecuencia en nuestro país son : Babesia bigemina, Babesia bovis, Anaplasma marginale y en menor incidencia Eperythrozoon weyoni. (7, 20, 21, 24)

Métodos para el examen de parásitos sanguíneos.

La muestra debe ser tomada preferentemente de la sangre periférica que corre a través de los capilares, porque en estos existe una mayor concentración de células infectadas, debido a que el volúmen circulante es menor que en los vasos de mayor calibre. Tomando en cuenta la aclaración anterior, se hará la descripción de una de las formas más usuales de preparar un frotis sanguíneo para determinación de hemoparásitos.

Los portaobjetos deben estar limpios y desengrasados perfectamente, esto se logra manteniendo los portaobjetos en una solución de alcohol - éter, el éter en una proporción del 3% en relación con el alcohol; los portaobjetos son retirados y secados al aire momentos antes de realizar el frotis. Solo se manejan por los bordes. Deben usarse dos portaobjetos por preparación. Se rasura el borde de la oreja, se limpian las costras de mugre, polvo y residuos de pelo. No debe aplicarse ningún líquido. (7, 24, 39)

Se punciona el borde de la oreja con una lanceta o aguja, o se hace un pequeño corte con las tijeras a nivel de la epidermis. Se exprime una gota de sangre y se recoge en un extremo del portaobjetos. Se coloca el otro portaobjetos sobre el primero formando un ángulo de 45° a nivel de la gota de sangre -- (ver técnica pag. 173) se deja que la sangre corra a lo largo del portaobjetos superior y con una suave presión se desliza hacia el extremo contrario del portaobjetos inferior, teniendo cuidado de que la película formada sea delgada y transparente. (7, 24, 39)

Una vez extendida la sangre en el portaobjetos, se seca al aire quedando lista para ser teñida.

Coloración de Wright.

Colorante de Wright en polvo	0.1 gr.
Alcohol Metílico absoluto	60 cc.

Moler el polvo del colorante con el alcohol en un mortero. Colocarlo en un frasco oscuro con tapón hermético y dejar en reposo durante 24 horas, filtrar y conservar en el frasco por espacio de una semana con el fin de que madure.

Solución Amortiguadora.

Fosfato de potasio	6.63 gr.
Fosfato de sodio	3.20 gr.
Agua destilada	1 000 ml.

El agua destilada sola puede ser utilizada como amortiguador.

Técnica de tinción.

Cubrir el frotis sanguíneo con el colorante contando las gotas.

Evitar la evaporación (colocarlo dentro de una caja de petri).

Esperar 5 minutos con el fin de que actúe el colorante.

Sin escurrir el colorante, agregar una cantidad igual de solución amortiguadora.

Dejar reposar la mezcla de 7 a 15 minutos. Sobre la superficie aparecerá una nata de color bronceado.

Lavar con agua corriente (sin escurrir el colorante) por 30 segundos mínimo. Colocarla sobre uno de sus extremos en papel secante.

Se observa al microscopio con el objetivo de inmersión. (6, 7, 24, 39)

Coloración de Giemsa.

Debido a las dificultades que se llegan a encontrar en su preparación, se reco-

mienda la adquisición de la solución de Giemsa ya preparada en forma comercial (Productos Sigma, Merck, y Reactivos Monterrey)¹.

Técnica de Tinción.

Se fijan las extensiones de sangre en alcohol metílico absoluto durante 3 a 5 minutos. Se deja secar.

Se llena un frasco de Coplin con la solución colorante de Giemsa, preparada - con una gota de colorante por cada mililitro de agua destilada neutra. El frasco debe tener suficiente colorante para cubrir completamente el portaobjetos. La preparación fijada y seca se deja en el colorante durante 30 minutos.

Se retira del frasco y se lava con agua destilada neutra y se deja que se seque al aire.

Se observa con el objetivo de inmersión. (6, 7, 24, 39)

Método de la Gota Gruesa.

Este método se usa pa investigar pequeñas cantidades de parásitos sanguíneos - y granulocitos eosinófilos, se pueden examinar simultáneamente varias capas de sangre con este método.

Se toman una o dos gotas de sangre.

Se extienden las gotas en una depresión del tamaño de 5 cm. en un portaobje - tos.

Secar al aire varias horas o en estufa de cultivo (37°C.), sin fijar ni forzar la desecación soplando, por calor directo o rayos del sol.

Añadir gota a gota agua destilada dejandola hasta que la mancha se ponga - de aspecto turbio lechoso (3 a 5 minutos), después de esto solo se ven los globulos blancos y algunos parásitos, de los globulos rojos se ve el estroma. Se tira el agua coloreada de rojo (sin lavar) y se deja que seque sola la - preparación.

Se tiñe por el método de Giemsa.

La tinción estará bien hecha si el centro se tiñe de azul y los margenes violeta.

Esta tinción sirve para la identificación de Plasmodium, y la observación de - filarias (30).

¹/ Estos productos se pueden encontrar en las diferentes casas distribuidoras de material y equipo para laboratorio.

B A B E S I A .



Especies bovinas de Babesia en eritrocitos.

A, B, C, D, Babesia bigemina

E, F, G, Babesia bovis

H, I, Babesia divergens

Lovine D. Norman,
Protozoan Parasites of Domes-
tic Animals and of Man.

EXAMEN MACROSCOPICO DE LAS HECES.

Consiste en hacer un análisis a simple vista del contenido de la materia fecal con el propósito de identificar o detectar la presencia de parásitos adultos. También dentro de este exámen se tomaran en cuenta color, olor, consistencia y contenidos extraños.

Método.

Consiste en desmenuzar perfectamente la materia fecal sobre una charola de fondo oscuro, con el fin de que contrasten los vermes que pudieran estar presentes. Si la materia fecal se encuentra muy compacta se podrá adicionar una pequeña cantidad de agua, con el fin de suavizarla y lograr un mayor esparcimiento de las heces. (7, 30, 39)

EXAMEN MICROSCOPICO DE LAS HECES.

Existen diferentes técnicas microscópicas para la observación de huevecillos de diversos parásitos, de diferentes clasificaciones como son: Nemátodos, Helmintos, Tremátodos y algunos protozoarios.

Técnicas Cualitativas.

Una de las técnicas más rápidas y sencillas consiste en colocar una cantidad pequeña de heces, del tamaño de un grano de trigo, en un portaobjetos, se agregan dos gotas de agua, se mezclan y se quitan los fragmentos gruesos de material vegetal y se coloca un cubreobjetos, procurando que la preparación quede transparente.

Este método tiene el inconveniente de que por ser tan pequeña la cantidad de heces se puede obtener un resultado parcial. (6, 7, 24, 39)

Técnica de la solución saturada de azucar o glucosa.

Se toma un gramo de heces y se coloca en un vaso de precipitados. Agregar agua tibia hasta obtener una mezcla homogénea; se filtra en un sedazo o coladera de malla fina.

Se llena 1/3 de un tubo de centrífuga con las heces diluidas; agregar las 2/3 partes restantes del tubo con la solución saturada de azucar o de glucosa.

Centrifugar a 1 500 r.p.m. durante 3 minutos.

Dejar que repose de 3 a 5 minutos. Tomar con un gotero o agitador de vidrio, de la parte superficial del líquido del tubo, colocar unas gotas en un portaobjetos y aplicar un cubre.

Se observa la preparación al microscopio con el objetivo 40 X. (6, 7, 30, 39)

Técnicas Cuantitativas.

Método de Stoll.

Se pesan 4 gramos de heces y se colocan en un matraz que tenga una marca de

60 c.c.; se agrega una solución 0.1 N de NaOH, hasta la marca, se introducen algunas pequeñas perlas de vidrio, se tapa el recipiente y se agita el contenido hasta que la materia fecal quede homogenizada.

Se toman 0.15 c.c. de la suspensión con una pipeta y se llevan a un portaobjetos, se cierra con un cubreobjetos y se cuentan los huevos en esta porción de la muestra, el número total se multiplica por 100 para obtener el número de huevos por gramo de heces. (7, 24, 30, 39)

Método de Mc. Master.

Para realizar esta técnica se debe de contar con un recipiente de vidrio o plástico con tapa (generalmente cilíndrico), que contenga una marca al nivel de 42 ml., y otra en el nivel de 45 ml.

Se coloca solución saturada de glucosa o cloruro de sodio en el recipiente -- hasta la marca de 42 ml.

Se pesan 3 gramos de heces y se colocan en el mismo recipiente, se agregan -- unas perlas de vidrio y se agita con el fin de homogenizar la muestra.

Inmediatamente tomar con un gotero muestras de diferentes profundidades y colocarlos en los dos cuadros de la cámara de Mc. Master². Contar todos los huevos y quistes de los dos cuadrantes de la cámara. Para obtener el número de -- huevos por gramo, se multiplica la cantidad de huevecillos obtenidos en el -- conteo por 100.

Este método solo será útil cuando en número de huevos en la materia fecal sea mayor a 100 huevos por gramo. (7, 24, 30, 39)

Técnicas para determinación de Fasciola hepatica.

Los métodos más usados son los de flotación y sedimentación, además existen -- otras pruebas como las serológicas, inmunológicas y fluorescentes. Entre es -- tas se pueden mencionar:

Prueba de precipitación en gel, en sus diferentes variedades, la de Oudin -- Oakley-Fulthorpe y la de Ouchterlony. (10)

Prueba de anticuerpos fluorescentes, que puede ser directa o indirecta. (10)

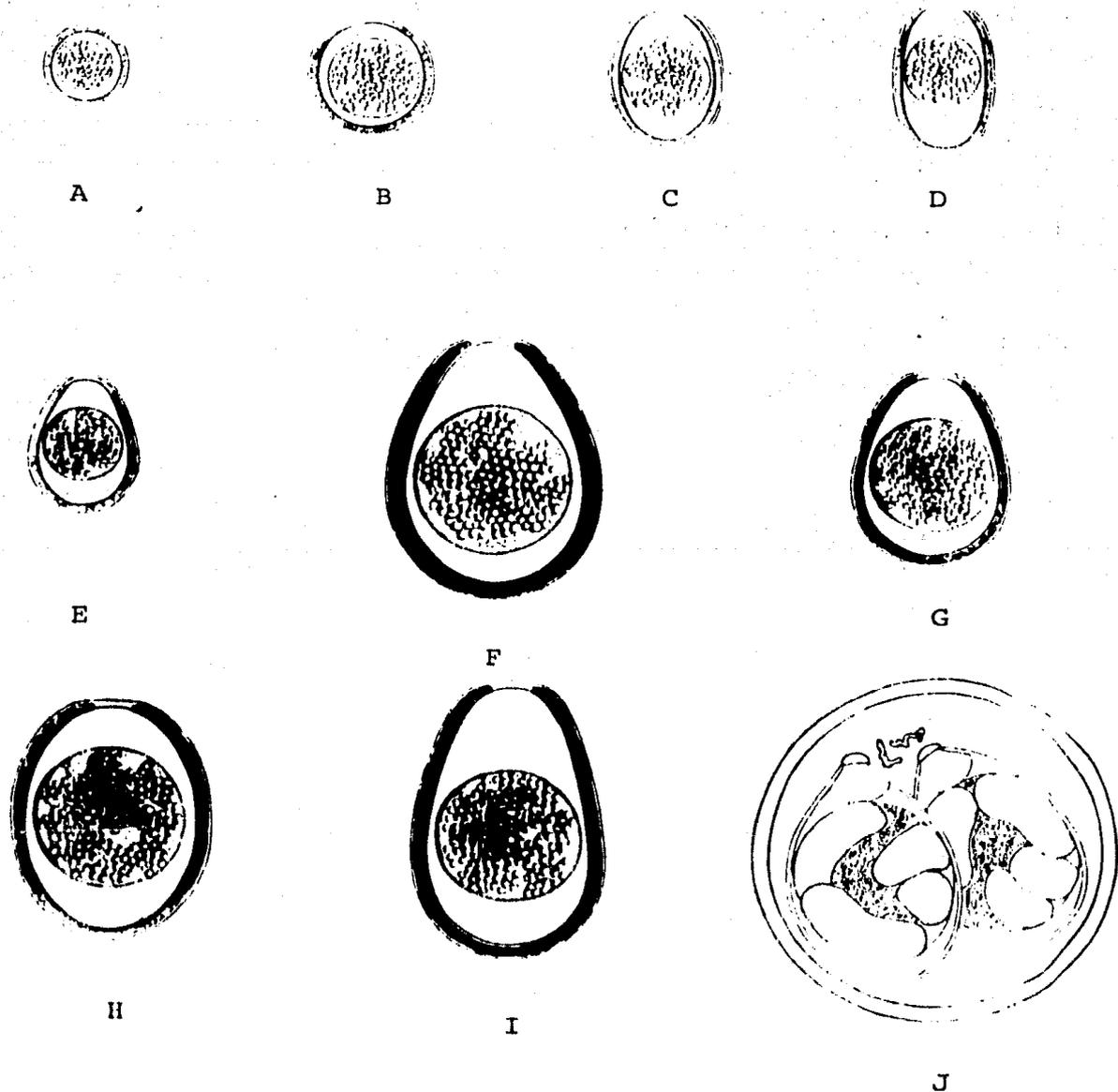
Prueba de intradermo reacción. (10, 18)

Prueba de sedimentación cualitativa.

Se toman dos gramos de heces y se disuelven en 40 c.c. de agua tibia, se ha -- cen pasar a través de un sedazo de 0.1 a 0.3 mm. en la malla; se dan tres la vados a la muestra y se observa en caja de petri al microscopio estereoscópi -- co. (6, 7, 10, 39)

2/ La cámara de Mc. Master consta de un portaobjetos y un cubreobjetos, unidos formando dos cámaras de un centímetro cuadrado cada una, estas áreas estan marcadas con una cuadrícula. La profundidad de la cámara es de 1.5 mm.

COCCIDIAS EN BOVINOS.



A. Eimeria subspherica, B. Eimeria zurnii, C. Eimeria ellipsoidalis, D. Eimeria cylindrica, E. Eimeria alabamensis, F. Eimeria bukidnonensis, G. Eimeria bovis, H. Eimeria canadiensis, I. Eimeria auburnensis, J. Isospora sp.

Sedimentación y Flotación Cuantitativas.

Técnica de Sewell.

Se coloca 1 gr. de heces en agua suficiente para llenar un tubo de centrifuga; se centrifuga a baja velocidad y se tira el sobrenadante, el sedimento se re-suspende con una solución saturada de cloruro de sodio, se vuelve a centrifugar y se tira el sobrenadante, se suspende nuevamente el sedimento en una solución de sulfato de zinc con densidad de 1.30 a 1.35, se llena perfectamente el tubo y se coloca un papel de celulosa, se centrifuga a 1 500 r.p.m. durante 3 minutos, se retira el papel, se coloca sobre un portaobjetos y se observa al microscopio.

Esta técnica tiene una efectividad del 82 %. (18)

Larvas de Nemátodos.

Método de Bermann.

Las heces se depositan en un embudo de vidrio de tamaño mediano, en cuyo interior hay una coladera de malla fina o una bolsa de gasa. El embudo adaptado para este fin se llena con agua destilada o solución salina fisiológica a 20-25° C., de manera que la masa de heces se cubra en la mitad de su altura. El extremo del embudo termina en un tubo de goma, cuyo diámetro se regula con unas pinzas metálicas. Las larvas se reúnen al cabo de 3 a 6 horas (en ocasiones precisan de 12 a 24 horas), en el agua que se encuentra en el tubo de goma por encima de la pinza metálica; abriendo esta llave se depositan 2 o 3 gotas en un vidrio de reloj o caja de petri y se observa al microscopio

Una modificación que se puede realizar, es coleccionar el agua que se encuentra por encima de la pinza metálica en un tubo de centrifuga, se centrifuga a baja velocidad de 1 a 2 minutos, se decanta el sobrenadante, se toma una gota del sedimento con una pipeta Pasteur, se coloca entre un porta y un cubre y se observa al microscopio. (6, 7, 39)

CULTIVO DE LARVAS.

Técnica de Komilla.

Las heces con huevos o larvas de nemátodos que se desean cultivar se mezclan con un 10 % de su volumen de carbón vegetal o animal en polvo.

Se hace una mezcla pastosa (si las heces estan muy secas se adiciona una pequeña cantidad de agua destilada).

La mezcla se coloca sobre un disco de barro previamente humedecido.

Se coloca el disco con las heces en el centro de una caja de petri de 2 cm. de profundidad y 10 cm. de diámetro.

Se adiciona una pequeña cantidad de agua en la caja de petri, con el fin de -- mantener húmedo el medio de cultivo.

Se coloca la caja de petri en cámara húmeda, se incuba a temperatura ambiente o bien en estufa a 25 - 30°C.

Las larvas al nacer emigran hacia el agua periférica, de donde pueden ser tomadas con una pipeta Pasteur.

Para su observación, el material pipeteado se coloca en un vidrio de reloj y se observa al microscopio estereoscópico. (6, 7, 39)

Técnica de Lammier.

En un vaso de plástico se colocan aproximadamente 5 grs. de heces con dos cucharadas de serrín estéril.

Se mezclan perfectamente (se puede agregar agua destilada si la consistencia de las heces es dura), procurando que la mezcla quede de consistencia pastosa. El vaso se coloca en una charola de plástico de unos 20 o 25 cms. de alto, a la que se pone agua hasta cubrir perfectamente el fondo de ésta, la cual se tapa con una placa de vidrio, se coloca en la estufa de cultivo a 27°C.

Durante 10 a 12 días los cultivos se deben mover diariamente para ver que no les falte humedad y a la vez para que se oxigenen, ya que para el desarrollo de la tercera larva es necesario que el cultivo tenga humedad, temperatura y oxígeno.

En este medio de cultivo se usa serrín estéril para evitar el desarrollo de gusanos de vida libre que se pudieran hallar en él, además porque absorbe humedad y conserva la temperatura, así como por su testura permite la penetración de oxígeno hasta el fondo del vaso. Se deja el cultivo el tiempo señalado para que alcancen todas las larvas su tercer estado o puedan eclosionar las que alcanzan este estado dentro del huevo. (10)

b). PARASITOSIS EXTERNAS o ECTOPARASITOSIS.

Como ya se menciono anteriormente estas se van a localizar principalmente en el pelo, piel y tejido subcutáneo. Estos problemas estan causados generalmente por los artrópodos que a continuación se mencionan:

Acaros.

En los bovinos se pueden encontrar cuatro géneros diferentes de ácaros: Psoroptes, Chorioptes, Sarcoptes, y Demodex (lamina pag. 147).

Cuando se sospecha de una parasitosis causada por ácaros, se procede a tomar una muestra de la piel, a través de un raspado con una hoja de bisturí con glicerina o aceite mineral, este raspado debe ser profundo, hasta que brote sangre, se deposita en una laminilla y se observa directamente, o se procede a poner las costras en una solución de hidroxido de sodio o de potasio al 2 % para

HUEVECILLOS DE PARASITOS GASTROENTERICOS EN BOVINOS.



ESTRONGILIDO

TRICOSTRONGILO



STRONGILOIDES



Nematodirus



Moniezia sp.



Fasciola hepatica



Trichuris sp.



Paramphitomum cervi

NOTA. Para conocer el género y especie de los parásitos gastroentericos, será necesario realizar el cultivo de larvas (pag. 143)

Coffin D. L.
Lab. Clínico en Médi -
cina Veterinaria

desquitinizarlos. Se observan al microscopio con el objetivo panorámico o el seco débil. (6, 7, 24, 39)

Garrapatas.

Son distinguibles fácilmente en el animal cuando se encuentran en la superficie (el género Otubius se encuentra en la cara interna del pabellón de la oreja). Su colección se puede realizar por medio de unas pinzas de disección o por acción digital, procurando que al desprenderlas las piezas bucales no queden en la piel. Se colocan en un frasco con un papel filtro impregnado en solución salina para conservar la humedad. (lamina pag. 148) (6, 7, 24, 39)

Piojos.

Muchas especies de piojos y sus huevecillos son lo suficientemente voluminosos para ser observados a simple vista, aunque una lupa puede ayudar a su descubrimiento. Los piojos pueden observarse al microscopio con varios aumentos; montados en agua, glicerina, aceite o un agente clarificador como el indicado para ácaros (lamina pag. 149). (6, 7, 24, 39)

Larvas de moscas.

La mayor parte de estas larvas se encuentran en casos de miasis. Estas se obtienen directamente de las heridas, se colocan en solución salina y se llevan con el Entomólogo para realizar la identificación; otros tipos de larvas se pueden encontrar formando nódulos en el tejido subcutáneo (Hypoderma bovis), en este caso es necesario realizar la disección de los nódulos para obtener las larvas.

ACAROS CAUSANTES DE LA SARNA EN LOS BOVINOS.
(vistas ventrales de las hembras)

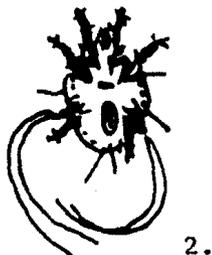


1. Psoroptes communis

Se hallan en la cola y ubre de la vaca.
Se localizan superficialmente en la piel, vi-
viendo en los surcos formados por su activi-
dad en el huésped.

Es el mayor de los ácaros causantes de sarna
encontrado en mamíferos. Presenta succionado-
res tarsales, originados en pedículos segmen-
tados.

Su cuerpo mide de 300 a 600 micras.



2. Chorioptes spp.

Se encuentra en la pata y base de la cola
del ganado vacuno.

La localización de este parásito en la piel
es semejante a Psoroptes.

Los elementos de succión se encuentran en
pedículos cortos no segmentados.

El acaró de mediano tamaño, mide de 180 a 400
micras.



3. Sarcoptes scabiei

Se halla casi en la totalidad de los mamífe-
ros.

Habita en las zonas del cuerpo con escaso pe-
lo, en las capas profundas de la piel donde
la hembra abre sus túneles.

Los succionadores tarsales se encuentran en
el primero y segundo pares de patas de la hem-
bra, y en el primero, segundo y cuarto pares
del macho.

Mide de 150 a 300 micras de longitud.



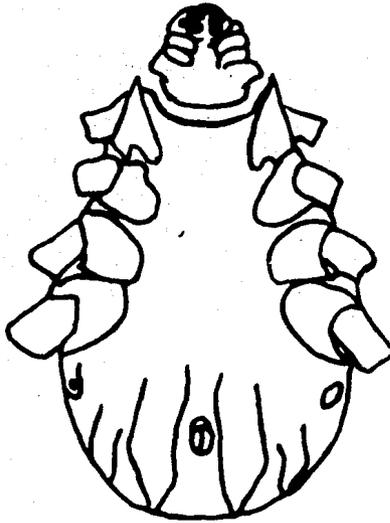
4. Demodex spp.

Se puede encontrar en abscesos cutáneos y der-
matitis escamosa del ganado vacuno ocasionando
la sarna demodéctica.

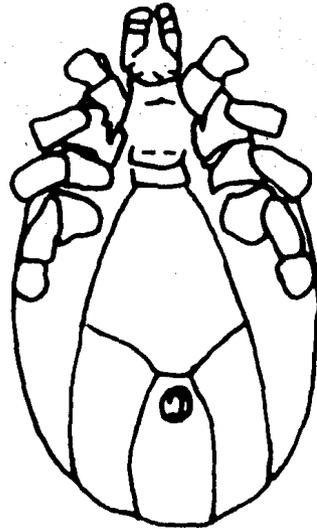
Se localiza profundamente en los folículos pi-
losos y glándulas sebáceas.

Tiene forma de gusano con patas apenas esboza-
das. Mide de 200 a 300 micras de longitud.

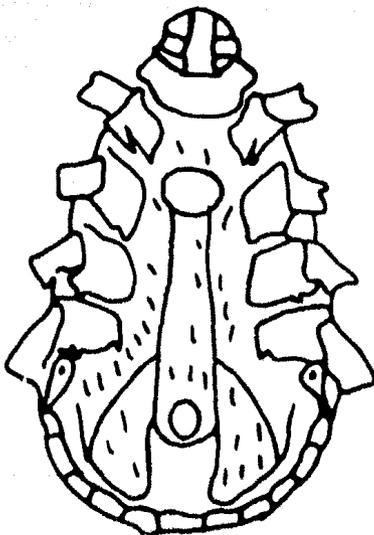
VISTA VENTRAL DE LAS GARRAPATAS MAS COMUNES EN EL GANADO VACUNO.



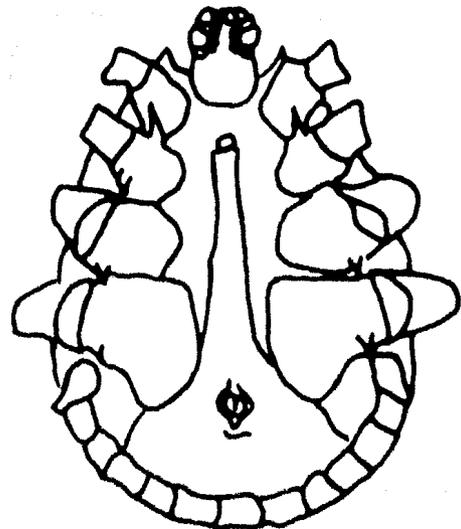
Boophilus



Ixodes

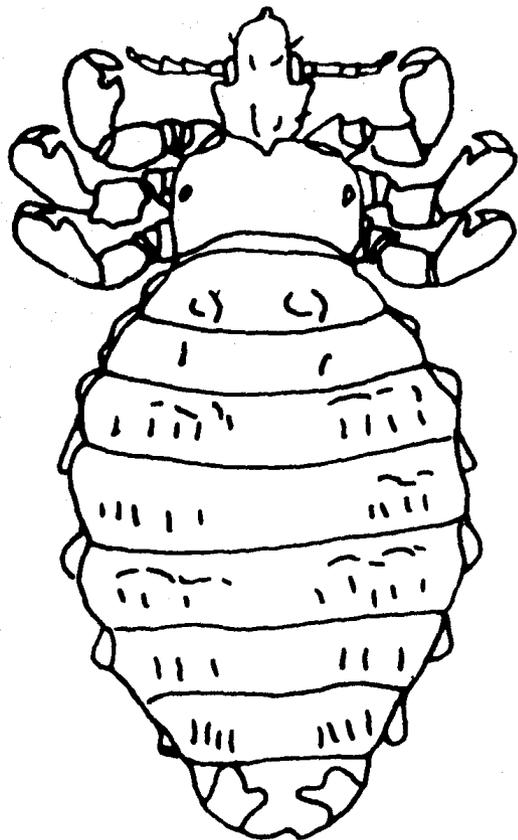


Rhipicephalus



Dermacentor

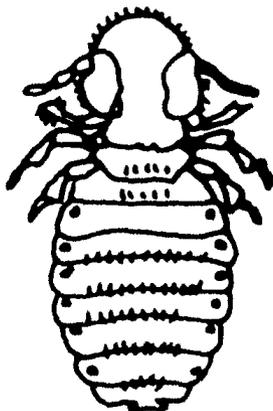
PIOJOS DE BOVINO.



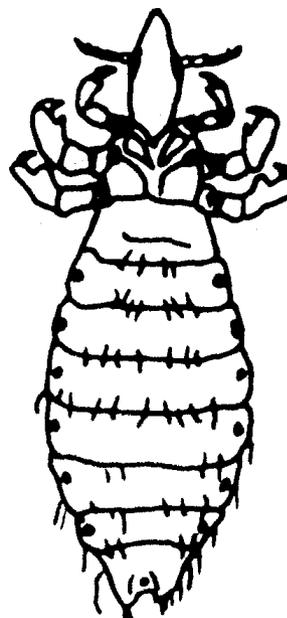
Hematopinus eurysternus.



Selenoptes capillatus.



Damalina bovis.



Linognathus vituli.

V. SEROLOGIA .

1. PRUEBAS DE AGLUTINACION PARA DETERMINACION DE BRUCELOSIS.

INTRODUCCION.

Las pruebas serológicas son de fundamental importancia en la determinación de algunas enfermedades infecciosas, tal es el caso de la brucelosis. Son ampliamente conocidas las pruebas de seroaglutinación empleadas por los programas de control y erradicación de esta enfermedad, las cuales tienen algunas limitaciones como son: dificultad para detectar la enfermedad en el período de incubación.

En estados crónicos de la enfermedad, los títulos de anticuerpos, frecuentemente son irregulares, ya que caen a niveles bajos y fluctúan durante un período de tiempo.

Particularmente en brucelosis, se presenta la dificultad para distinguir anticuerpos producidos por la infección natural de aquellos anticuerpos producidos por reciente vacunación.

Así tenemos que las pruebas serológicas más utilizadas en el diagnóstico de brucelosis son las siguientes:

1. Prueba de aglutinación lenta en tubo.

Presenta limitaciones como son la de no poder diferenciar anticuerpos vacunales (Cepa 19) de aquellos producidos por la infección natural, tampoco permite detectar anticuerpos de infecciones recientes o estados de cronicidad, en ocasiones de reacciones cruzadas con anticuerpos de otros microorganismos, tales como: Yersinia enterocolitica serotipo IX.

.2 Prueba de fijación de complemento.

Es más exacta y sensible, detecta anticuerpos producidos por la vacuna Cepa 19 hasta seis meses después de la vacunación, en estados de infección crónica los anticuerpos persisten durante mucho tiempo. La combinación de estas dos pruebas no permite una identificación más eficiente de los animales infectados.

.3 Prueba del antígeno acidificado tamponado.

Esta prueba recibe diferentes nombres, tales como: "Buffered Brucella Antigen": "Rose Bengal Plate Test"; L' Epreuve a L' Antigene Tamponne y en México se conoce con el nombre inadecuado de Prueba de la Tarjeta o "Card Test".

Esta prueba tuvo su origen en la prueba de la placa con Antígeno Acidificado, introducida por Rose y Roepke (1957) que consistía en una mezcla del antígeno de placa con tres diferentes ácidos: ácido acético glacial concentrado, ácido láctico concentrado y ácido tartárico al 60%, el pH bajo (3.6) de este antígeno no era estable y tenía que ser preparado diariamente.

Estos autores observaron que con ese pH se destruía la actividad de las aglutininas no específicas (IgM), dejando sin afectar las específicas (IgG). Por lo tanto se concluyó que esta prueba es de gran valor como prueba complementaria para determinar solo aglutininas específicas (IgG).

En 1967 Pietz D.E. y Schilf, E.A., desarrollaron el antígeno acidificado tamponado estable que consiste en una suspensión de Brucella abortus Cepa 1119-3 en una concentración de 8% bufferada a un pH de 3.65 ± 0.05 y teñida con Rosa de Bengala.

Material.

- Suero problema.
- Antígeno de tarjeta (I.N.I.P.)
- Placa de vidrio de fondo blanco.
- Pipetas de Bang.
- o pipetas automáticas (Eppendroff).
- o pipetas de 1 ml calibradas en centésimas.
- Palillos.

Método.

Sacar los sueros problema, sueros control y antígeno del refrigerador y dejarlos a temperatura ambiente durante 1/2 - 1 hora antes de realizar la prueba.

Depositara 0.03 ml del suero problema sobre la placa de vidrio.

Depositara una gota de 0.03 ml del antígeno acidificado tamponado a un lado de la gota de suero (no dentro de ella).

Mezclar perfectamente el antígeno con el suero utilizando para cada muestra el extremo de un aplicador de madera o un palillo.

Después de mezclarlo, se imprime al soporte un ligero movimiento de vaivén o bien utilizando un aparato mezclador, durante 4 minutos.

Pasados los 4 minutos se procede de inmediato a efectuar la lectura.

Resultados.

- (-) No aglutinación.
- (+) Cualquier grado de aglutinación.

1. Equipo y reactivos para prueba de aglutinación lenta en tubo.

- Antígeno Brucella abortus cepa 1119-3 para prueba en tubo (I.N.I.P.)
- Tubos de vidrio Pyrex de 13 X 100 mm
- Gradilla para tubos 13 X 100 mm con capacidad para 24 tubos
- Pipetas de Bang 0.2 ml, para el método de dilución decimal
- Pipetas serológicas de 2.0 y 0.2 ml graduadas en décimas para el método de dilución múltiple
- Jeringa automática de 2.0 ml
- Estufa incubadora 37.5°C
- Lámpara de luz fluorescente con fondo negro
- Pipetas automáticas de 2.0 ml
- Dilución del antígeno para la prueba en tubo.

El antígeno ha sido estandarizado para poseer una concentración celular equivalente al 4.5%, para realizar la prueba es necesario diluir el antígeno a una concentración celular equivalente a 0.045%.

La dilución deberá realizarse cuando menos 12 horas antes de utilizarse y conservarse en refrigeración.

Dilución del antígeno.

El antígeno deberá diluirse con una solución salina fenolada al 0.5%, la cual deberá prepararse de la siguiente manera:

Cloruro de sodio	25.5 g
Fenol	15.0 g
Agua destilada	3000 ml

Proporciones:

Antígeno para la prueba en tubo estandarizado 30.0 ml
Solución salina fenolada 2 970 ml

Procedimientos

a) Método de dilución decimal.

Para cada muestra deberán utilizarse 5 tubos que corresponden

den a las diluciones 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400.

Antes de realizar la prueba sacar el suero y el antígeno del refrigerador y exponer a temperatura ambiente de 30 a 60 minutos.

Identificación de los tubos, generalmente se identifica solo el primer tubo de la serie de cinco, pero se habrá de tener cuidado de no revolver estos tubos con las series de otras muestras que se estén trabajando a la vez.

En el primer tubo se depositan 0.08 ml de suero, en el segundo 0.04 ml, en el tercero 0.02 ml, en el cuarto 0.01 ml, en el quinto 0.005 ml.

Con una jeringa automática se depositan 2.0 ml del antígeno diluido dentro de cada tubo que contiene el suero problema.

Los tubos son agitados durante 30 segundos para lograr la homogenización de las muestras.

Incubar los tubos a 37.5°C durante 48 horas y leer la reacción.

b) Método de dilución múltiple.

Sacar el suero y el antígeno del refrigerador de 30 a 60 minutos antes de efectuar la prueba.

Identificación de los tubos.

Con la pipeta serológica de 0.2 ml se obtiene el suero problema y se depositan en el fondo del primer tubo 0.16 ml, a esto se adicionan 4.0 ml de antígeno diluido.

En los tubos siguientes colocar exclusivamente 2.0 ml de antígeno diluido. Con una pipeta automática con capacidad de 2.0 ml, se traslada sucesivamente 2.0 ml del primero al quinto tubo.

Diluciones obtenidas: 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400.

Se incuba a 37,5°C durante 48 horas. Hacer la lectura.

c) Método alterno de dilución múltiple.

Para efectuar esta prueba se utilizará el antígeno de *Brucella abortus* cepa 1119-3 utilizando una concentración de doble concentración, la cual se prepara de la siguiente manera:

Cloruro de sodio 12.25 g
Fenol 7.50 g
Agua destilada 1 500 ml

Se utilizarán 5 o más tubos por cada muestra.

Sacar el antígeno y el suero del refrigerador de 30 a 60 minutos antes de realizar la prueba.

Identificación de los tubos.

Con una pipeta serológica de 0.2 ml. se obtiene el suero problema. En el fondo del primer tubo de la serie se depositan 0.16 ml del suero problema.

Con una jeringa o pipeta automática se depositan en el primer tubo 2.0 ml de solución salina fenolada al 0.5%

Con una pipeta serológica de 1.0 ml se deposita 1 ml de solución salina fenolada al 5%.

Con una pipeta serológica de un mililitro se mezcla perfectamente el contenido del 2º tubo y se traslada un mililitro al tercero y así sucesivamente. El mililitro restante del último tubo se tira.

Con una pipeta o jeringa automática se coloca un mililitro de antígeno a concentración doble en cada uno de los tubos.

Se incuban a 37.5°C durante 48 horas.

Resultados.

Para observación de la lectura de la prueba, deberá utilizarse luz fluorescente indirecta con fondo negro. La utilización de otro tipo de luz reduce la capacidad de observación de los resultados. Antes de realizar la lectura agitar para observar los grumos en suspensión.

Reacción positiva.

Los tubos se observan claros antes de ser agitados. Los grumos en suspensión no se disuelven al agitar.

Reacción incompleta.

Parcialmente clara, al agitarse se observan grumos que no se disuelven.

Reacción negativa.

Es turbia y al agitar no se encuentran grumos en suspensión.

NOTA: La muestra de sangre para realizar cualquier estudio inmunológico referente a Brucella, se tomará 15 días después de que el animal haya sufrido el aborto, y se harán muestreos posteriores con una periodicidad de 30 días en animales sospechosos, de resultar estos positivos en el segundo muestreo se eliminan.

Prueba rápida en placa (Huddlesson).

Es la más utilizada, pero es inespecífica ya que al igual que la prueba lenta en tubo no elimina anticuerpos vacunales. En esta prueba la cantidad de antígeno es constante y el suero es el que se diluye.

Material

- Suero problema
- Antígeno (I.N.I.P.)
- Placa de vidrio
- Pipetas de 0.2 ml
- o pipetas de 1 ml graduadas en centésimas
- Aplicadores
- Fuente de luz indirecta (aglutinoscopio).

Método

Colocar con la pipeta de 0.2 ml sobre la placa de vidrio las siguientes cantidades de suero: .08, .04, .02, .01, .005 (las cuales corresponden a las siguientes diluciones: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 respectivamente).

Agregar una gota de antígeno (I.N.I.P.) de .03 ml.

Mezclar las dos gotas con un aplicador, empezando por la dilución menor (de .005 a .08), una vez efectuado esto se imprimirán a la placa ligeros movimientos de rotación hacia el lado derecho y hacia el lado izquierdo, cuidando que éstos sean en igual número.

Se deja reposar la prueba durante 5 minutos, después de lo cual se hará la primera lectura para ver como van evolucionan

do las aglutinaciones. La placa se volverá a rotar en forma semejante a la inicial y se dejará reposar 3 minutos más.

Pasado este lapso se hará la lectura por medio de la fuente de luz indirecta.

1.8.3 Resultados 1/

BOVINOS NO VACUNADOS O VACUNADOS A UNA EDAD MAYOR DE 8 MESES

1/25	1/50	1/100	1/200	INTERPRETACION
-	-	-	-	Negativo
I	-	-	-	Negativo
+	-	-	-	Negativo
+	I	-	-	Negativo
+	+	-	-	Sospechoso
+	+	I	-	Sospechoso
+	+	+	-	Positivo
+	+	+	I	Positivo

BOVINOS DE 30 MESES O MAS VACUNADOS A LA EDAD DE 4 - 8 MESES

1/25	1/50	1/100	1/200	INTERPRETACION
-	-	-	-	Negativo
I	-	-	-	Negativo
+	-	-	-	Negativo
+	I	-	-	Negativo
+	+	-	-	Negativo
+	+	I	-	Sospechoso
+	+	+	-	Sospechoso
+	+	+	I	Sospechoso
+	+	+	+	Positivo

1/ Centro Panamericano de Zoonosis. Técnica de Sero-Aglutinación
Organización Panamericana de Salud. OMS.

2. PRUEBAS DE AGLUTINACION PARA DETERMINACION DE LEPTOSPIROSIS.

Introducción.

La leptospirosis es una enfermedad causada por gérmenes del género *Leptospira*, que afecta a numerosas especies animales y al hombre.

En México los primeros casos de Leptospirosis fueron señalados por Gastelum y Castañeda en 1928, aislaron leptospiras en *Rattus norvegicus* en Veracruz; según Varela y Roch. En 1930 en una exploración serológica, Varela y Vázquez encontraron sueros positivos. La mayoría de estos estudios serológicos se llevaron a cabo utilizando sólo tres antígenos, *L. icterohemorragica*, *L. pomona* y *L. canícola*; Méndez (1963) utilizó 980 sueros de bovinos y con antígenos de *L. pomona* no observó reacciones positivas, Muria (1965) obtuvo resultados similares; Kcken (1967) en un estudio de 574 sueros de bovinos encontró el 19.8% de sueros positivos a *L. hardjo*, el 24% a *L. hyos*, el 19% a *L. icterohemrragica* y el 16% en otros serotipos; Rodríguez (1969) presentó resultados similares utilizando 160 sueros de bovinos con historia de abortos, el 20% resultó positivo y en orden de importancia fueron: *L. wolffii*, *L. javanica*, *L. medanensis*, *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. hebdomadis*, *L. hyos*, *L. batavie*, *L. ballum*, *L. icterohemorragia A* y *B*, *L. canicola*, *L. gryphotyphosa* y *L. borincana*; en estudio de rutina diagnóstica Ortega y González (1972) han obtenido resultados similares.

En México sólo existe un biológico para la prevención de *Leptospira* y éste es el preparado con *L. pomona*, serotipo que según los estudios realizados por Dikken (1967) no es tan importante como *L. wolffii*, *L. serjoe*, y *L. hardjo* en bovinos de México.

Técnica.

Leptospirosis, prueba de Aglutinación-lisis.

La prueba se puede realizar con suero u orina del animal sospechoso. Antes de efectuar la prueba se debe comprobar la viabilidad del antígeno vivo (*Leptospira*), en el medio de Stuart, su densidad y ausencia de autoaglutinación.

- a) Diluir el suero o la orina 1:20
- b) Utilizando una placa para microtítulo de fondo plano agregar una gota de solución salina con una pipeta calibrada a 0.025 por gota a cada una de las cavidades (11 en total).
- c) Agregar 2 gotas de la muestra diluída 1:20 a la primera cavidad.

- d) Comprobar la eficacia de las asas de dilución antes y después de la prueba.
- e) Utilizando las asas para microdilución calibradas a 0.025, hacer diluciones en forma seriada de 1:40 hasta 1:960.
- f) Agregar una gota del antígeno de Leptospira con un gotero calibrado a 0.025 a cada cavidad, de la segunda a la doceava.
- g) Incubar a 37°C durante 1/2 hora.
- h) Controles positivos y negativos deben de ser incluidos siempre en la prueba.

Resultado.

La lectura se puede hacer mejor en gota en portaobjetos con el microscopio de campo oscuro con el objetivo del seco fuerte y sin cubreobjetos, lo ideal es utilizar la misma caja de plástico de dilución que por su fondo plano nos facilita el manejo y observación de todas las diluciones.

Positivo.

Aglutinación de las leptospiros, siendo el punto "N" la dilución máxima en la cual se observa aglutinación en una proporción de la mitad de las Leptospiras que se observan en el control.

Negativo.

No existe aglutinación y se observan las Leptospiras libres en el medio.

Material.

- a) Placas para microtítulo desechables con 96 cavidades Lab. Limbo Chemical Co. U.S.A.
- b) Asas de dilución para microtítulo, Cooke Engineering Company, Alexandria, Virginia.
- c) Antígenos vivos a utilizar en el laboratorio.

NOTA: Los tipos de antígeno dependerán de la especie y serotipo que se presente con mayor frecuencia en el área de trabajo.

Serotipos comúnmente utilizados en los laboratorios :

- L. canicola
- L. icterohemorrhagiae
- L. pomona
- L. hardjo
- L. grippotyphosa

NIVELES SERICOS DE Ig. (Método de turbidez del $ZnSO_4$)

Generalidades.

Se muestrearán becerros entre el 2º y 3er. día de nacidas, tomándose una muestra de sangre de 7 ml aproximadamente por punción en la vena yugular, con aguja calibre 18. La sangre será colectada en tubo de ensaye 100 x 60, estéril, sin anticoagulante.

Material.

- Muestra de sangre de 7 ml aprox. sin anticoagulante
- Pipetas de 10 ml 10:1
- Pipetas de 1 ml 1:10
- Tubos de ensaye 150 x 60
- Solución de $ZnSO_4$ (0.208 g de $ZnSO_4$ para 1 000 ml de agua bidestilada)
- Espectrofotómetro (500)
- Centrífuga

Método.

Se retira el coágulo formado en la muestra y se centrifuga a 1 500 r.p.m. durante 5 minutos.

Se procede a colocar 6 ml de solución $ZnSO_4$ en un tubo de ensaye de 150 x 60 y en otro tubo igual se colocan 6 ml de agua bidestilada (tubo ajustador).

A cada uno de los tubos mencionados, se les adiciona 0.1 ml del suero obtenido por centrifugación. Se agitan, se dejan reposar los tubos un tiempo mínimo de 20 minutos; transcurrido este lapso se hace la lectura en el espectrofotómetro

La lectura real se obtendrá de acuerdo a las tablas previamente elaboradas y a los ajustes que se hagan con el tubo ajustador.

Resultados.

La interpretación de las lecturas de niveles de inmunoglobulinas se hará en base a la tabla que a continuación se presenta, la cual fue elaborada de acuerdo a las características del espectrómetro CORNING EEL, Modelo 197 Spectra.

<u>Lectura del tubo con Suero ZnSO₄</u>	<u>Equivalente en Unidades de ZnSO₄</u>
3.31	1
6.62	2
9.93	3
13.24	4
16.55	5
19.86	6
23.17	7
26.48	8
29.79	9
33.10	10
36.41	11
39.72	12
43.03	13
46.34	14
49.65	15
52.96	16
56.27	17
59.65	18
62.89	19
66.20	20
69.51	21
72.82	22
76.13	23
79.44	24
82.75	25
86.06	26
89.37	27
92.68	28
95.99	29
99.30	30
102.00	31
105.00	32
109.00	33
112.00	34
115.00	35
119.00	36

Para hacer más clara y objetiva la forma en la que se llega a obtener la lectura real de los niveles de inmunoglobulinas, se describirá un ejemplo:

La lectura del tubo que contiene suero ZnSO₄ da la lectura de 81 en escala del espectrofotómetro, se busca este número en la columna de la izquierda que corresponde a la lectura del tubo con suero más ZnSO₄, de no coincidir exactamente se tomará el número inferior inmediato, que en este caso correspondería al número 79.44 el cual equivale a 24 unidades de ZnSO₄, a este número se le resta la lectura obtenida a partir del tubo ajustador, el cual, en este caso, tendrá un valor de 2 unidades; estas 2 unidades se le restan a las 24 anteriormente obtenidas llegando así a la lectura real, que en este caso es de 22 unidades de ZnSO₄.

VI. HEMATOLOGIA.

1. RECOLECCION DE LA MUESTRA DE SANGRE

El procedimiento más común en los animales mayores, es obtener la sangre directamente en un tubo o matraz, los cuales contengan anticoagulante en la proporción conveniente, (5 ml de sangre es suficiente para la mayor parte de los exámenes hematológicos).

La sangre también se puede obtener por medio de succión con una jeringa, la cual deberá estar cubierta en su pared por anticoagulante, pero hay que tomar en cuenta que la fuerza de succión no sea demasiada, ya que ésta puede causar destrucción celular.

Las técnicas de punción varían en las diferentes especies; pero en bovinos las más usuales son: por punción en la vena yugular, en la vena mamaria y en la vena caudal.

La sangre deberá ser transportada al laboratorio en el menor tiempo posible y en condiciones de refrigeración.

2. ANTICOAGULANTES.

Son sustancias que inhiben la coagulación de la sangre al combinarse con diversos factores que intervienen en ésta. Los más usuales son:

a) EDTA (Sales bipotásicas y bisódicas del ácido etileno diamino tetraácetico).

Actúan como agentes quelados, por lo cual evitan la coagulación de la sangre al combinarse con el calcio. No produce alteraciones en el tamaño ni en las características de tinción, con facilidad de emplearse en forma líquida o sólida. En forma líquida, una gota al 10% es suficiente para evitar la coagulación de 5 ml de sangre. En forma de polvo puede emplearse a la concentración de 1 mg por 1 ml.

b) OXALATOS. Evitan la coagulación de la sangre al combinarse con el calcio.

Preparación oxálica de Heller y Paul (1934)

1.2 gr de oxalato de amonio
0.8 gr de oxalato potásico
100 ml de agua

Un milímetro de esta solución se deposita en un tubo de ensaye y se deja secar en la estufa de aire seco a 60°C, así se evita la coagulación de 10 ml de sangre.

Después de una hora de obtenida la muestra sufre alteraciones, lo que hace que las interpretaciones no sean tan precisas. Estas muestras no podrán ser empleadas para las determinaciones de Nitrógeno, debido a la presencia de amoniaco.

c) HEPARINA.

Interfiere la conversión de la protrombina, por lo tanto evita la coagulación de la sangre. Se puede emplear en forma líquida o en polvo. Se coloca en tubos de ensaye en los cuales se vierte la sangre.

Perturba las afinidades tintoriales de los leucocitos, es el más caro de los anticoagulantes, su eficacia se extiende de 10 a 12 horas.

d) FLUORURO SODICO.

A la concentración de 10 mg por cada 100 ml de sangre, también actúa como conservador de la glucosa.

e) CITRATOS.

Los citratos sódicos y potásicos pueden utilizarse como anticoagulantes, pero no se adaptan a la conservación de la sangre destinada a las determinaciones hematológicas.

3. MICROHEMATOCRITO.

Para esta determinación se recomiendan capilares de hematocrito de 7 cm de longitud y de un calibre aproximado de 1 mm.

Técnica.

Los tubos se llenan por capilaridad, la porción externa se limpia hasta que la terminal de la columna de sangre coincida con la marca que señala el otro extremo del tubo, este extremo se sella en la centrífuga, con el extremo sellado hacia la parte externa. Para evitar roturas, será conveniente dar unas vueltas manualmente; se coloca la cubierta metálica y se procede a centrifugar el tiempo recomendado por el fabricante (Clay Adms 1,200 rpm durante 5 minutos), el cual está calculado para la máxima aglomeración. Después de la centrifugación se hará la adaptación del tubo a la escala que se encuentra en el fondo, la línea inferior de la columna de sangre del tubo capilar deberá coincidir con el número 0 de la escala.

Limitaciones y causas de error.

El motivo de error más importante es que, debido a la centrifugación, leucocitos, plaquetas y plasma se encuentran prendidos entre los glóbulos rojos. Este error aumenta si la fuerza de centrifugación es baja o si el tiempo es menor, incluso en muestras correctamente centrifugadas el error se calcula entre 2.25% y 8.5%. Ha sido aceptado un factor de corrección del 5% para la determinación en perro y oveja, en tanto que éste es de un 6% en la vaca.

Ventajas.

- a) La sangre necesaria es mínima (0.065 ml).
- b) Menor tiempo en la operación (comparado con el método de Wintrobe).
- c) Los resultados obtenidos son más precisos.

Desventajas.

- a) Se requiere un fondo de lectura especial.
- b) No es posible determinar sedimentación.
- c) Es difícil apreciar la capa de glóbulos blancos.

4. CUENTA DE ERITROCITOS.

Material

- Sangre con anticoagulante (preferencia EDTA o a libre elección).
- Hemocitómetro 1/
- Pipeta de Thomas para glóbulos rojos
- Tubo de hule
- Líquido diluyente
- Contador manual
- Microscópio

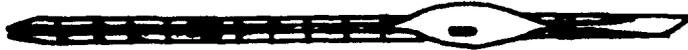
1/ El hemocitómetro consiste en un portaobjetos grueso que tiene dos plataformas elevadas. Sobre la superficie de las plataformas se encuentran dos áreas marcadas. Dos elevaciones de vidrio sostienen un cubreobjetos de vidrio grueso 0.1 mm arriba de las áreas marcadas.

EQUIPO NECESARIO PARA EFECTUAR RECuentOS TOTALES DE ERITROCITOS Y LEUCOCITOS.

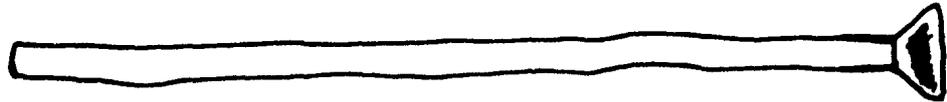
Pipetas de Thoma:



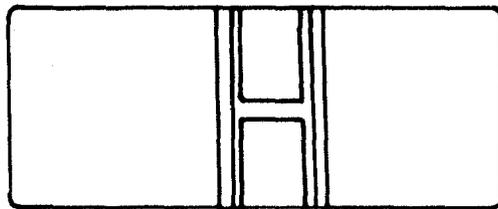
Pipeta para dilución de eritrocitos.



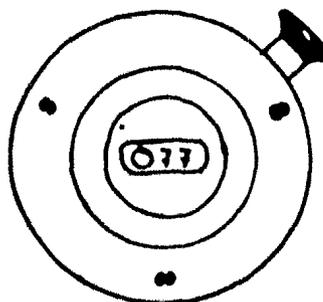
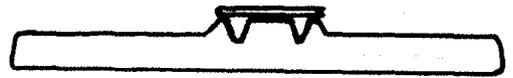
Pipeta para dilución de leucocitos.



Manguera de hule para succión



Camara cuenta globulos (Hemacitómetro)



Contador manual

Procedimiento

- Ensamble el tubo de hule a la pipeta de Thoma
- Aspire sangre mezclada con anticoagulante hasta la marca 0.5. Limpie cualquier exceso de sangre de la superficie exterior de la pipeta con un papel absorbente o algodón. Si se absorbe sangre arriba de la marca, ésta puede volver a la marca tocando la punta de la pipeta con papel absorbente o algodón.
- Absorba líquido diluyente hasta la marca 101. La dilución inicial debe ser rápida, ayudada por rotación de la pipeta entre el pulgar y el índice. A medida que el diluyente se acerca a la marca 101 la succión debe ser cuidadosa para evitar llenar arriba de la marca.
- Remueva la pipeta del diluyente, colóquela en posición horizontal y tape el orificio de la punta con el dedo índice. Remueva el tubo de hule y sostenga la pipeta entre el dedo pulgar y el índice, agite haciendo círculos en el aire.
- Inmediatamente después de mezclar deseche 3 gotas. Limpie la punta de la pipeta con algodón y aplique la punta de la pipeta al área entre el cubreobjetos y la plataforma. El líquido de la pipeta debe fluir debajo del cubreobjetos por capilaridad. Remueva la punta de la pipeta cuando la solución alcanza el borde de la plataforma y no más.

Cuenta.

Permita sedimentar las células por 3 minutos. Más de 3 minutos puede elevar la cuenta por evaporación. Después de esperar que sedimenten las células, localice el cuadro secundario central (dividido en 25 terciarios y 400 cuaternarios) con el objetivo seco débil, pasar después al seco fuerte y cuente las células de 5 cuadros terciarios (80 cuaternarios en total), los cuatro cuadros de las esquinas y el central.

El volumen contado es: $0.2 \times 0.2 \times 0.1 = 0.004 \text{ mm}^2$
 $0.004 \times 5 = 0.02 \text{ mm}^3$ ó $1/50$ de 1 mm^3 y debido a que la dilución es $1/200$ entonces $200 \times 50 = 10\ 000$.

El factor para convertir las células contadas a células por mm^3 es agregar cuatro ceros.

NOTA: En el conteo deberá tomarse en consideración la siguiente indicación: Cada célula que toca la parte superior e izquierda de los cuadros se cuentan y las que tocan las partes derecha e inferior no se cuentan.

5. CUENTA DE LEUCOCITOS.

Material.

- Sangre con anticoagulante (preferencia EDTA o libre elección).
- Hemocitómetro.
- Pipeta de thoma para glóbulos blancos.
- Tubo de hule.
- Líquido diluyente.
- Microscópio.
- Contador manual.

Procedimiento.

El procedimiento es semejante al que se sigue para la cuenta de eritrocitos. La pipeta es llenada con sangre hasta la marca 0.5 y se llena con diluyente hasta la marca 1.1

El proceso para el llenado del hemocitómetro es semejante al que se sigue con los eritrocitos.

Cuenta.

Los leucocitos se cuentan en los cuadros secundarios, situados en las esquinas del área marcada 4 mm (16 cuadros terciarios) con el objetivo seco débil y poca iluminación.

El volumen contado es: $1 \times 1 \times .1 = 0.1 \text{ mm}^3$ en un cuadro de 0.4 mm^3 .

Se requiere un factor de 2.5 para convertir la cuenta en 0.4 mm^3 a uno por un mm^3 .

Ya que la dilución es de 1/20, $20 \times 2.5 = 50$ que es el factor que se toma en cuenta para llegar a la cifra total de leucocitos.

CORRECCION DE LA CUENTA DE LEUCOCITOS.

Corrección de la cuenta de leucocitos debido a la presencia de eritrocitos nucleados.

El error admitido en el recuento total de leucocitos es de 10%, más o menos. Esta corrección se lleva a cabo si en el momento de efectuar el conteo diferencial de leucocitos se observan eritrocitos nucleados.

Número absoluto de Eritrocitos nucleados.

Número de eritrocitos nucleados contados en la cuenta diferencial de 100 leucocitos

100 más número de eritrocitos nucleados contados en la cuenta diferencial de 100 leucocitos.

Cuenta corregida de Leucocitos. Cuenta de leucocitos por mmc. menos cuenta de eritrocitos nucleados por mmc.

Ejemplo: En la cuenta diferencial de 100 leucocitos se encuentran 25 eritrocitos nucleados. La cuenta total de leucocitos es de 10,000 por mmc.

Eritrocitos nucleados $\frac{25}{125} \times 10,000 = 2,000$ por mmc.

Leucocitos cuenta corregida = 10000 - 2000 = 8,000

Causas más comunes de error en los procedimientos de recuento de Eritrocitos y leucocitos son las siguientes:

- Errores en la dilución
- Errores al contar.
- Calibración defectuosa de las pipetas y de las cámaras de recuento
- Falta de agitación del contenido de la pipeta después de haber procedido a la mezcla.
- Contaminación del líquido de dilución con levaduras, mohos y otras células.
- Olvido de quitar el exceso de sangre de la punta de la pipeta.
- Desecación de la muestra antes del conteo o en el curso del mismo.
- Inundación de los fosos por el líquido de la muestra.
- Mala iluminación del campo microscópico, lo que causa dificultad en la observación de los leucocitos.
- Falta de sedimentación y colocación de los glóbulos en planos diferentes, lo que impide su recuento preciso.
- Falta de limpieza de los instrumentos de cristal.
- Falta de eliminación del líquido de dilución antes de llenar la cámara.
- Empleo de pipetas rotas.
- Falta de buen enfoque mientras se procede al recuento.

PREPARACION DE FROTIS SANGUINEOS O EXTENSIONES DE SANGRE.

El examen de un frotis de la sangre periférica es uno de los procedimientos de laboratorio más informativo, en el caso de ciertas enfermedades de la sangre (Leucemia), identificación de hemoparásitos (piroplasma, anaplasma, dirofilaria, etc.) también ayuda en los juicios de diagnóstico y pronóstico de algunas enfermedades agudas generalizadas y aún en las localizadas.

La extensión de sangre debe hacerse tan pronto como sea posible después de la obtención de la muestra, puesto que los leucocitos y otros elementos celulares tienden a degenerarse rápidamente. Si se emplea EDTA como anticoagulante, la muestra se puede conservar por más tiempo.

Las extensiones de sangre pueden efectuarse en portaobjetos o en cubreobjetos, siendo más prácticos los primeros.;

Respecto a la tinción de éstos, se conocen muchos colorantes y diferentes técnicas de tinción, pero la mayoría son del tipo Romanowsky, en las cuales están incorporadas anilinas ácidas, con lo que se consiguen tonos de contraste en azul y rojo.

En esta variedad, los colorantes más conocidos y más empleados son los de Wright y Giemsa, los cuales pueden ser adquiridos comercialmente en forma de polvo o líquido. (preparación y técnicas ver Wright, Giemsa Tinción)

- Técnica de extensión sanguínea en portaobjetos.

Los portaobjetos deben estar limpios y desengrasados, se coloca en una superficie horizontal o simplemente se sostiene por los bordes entre el dedo índice y el pulgar (Fig. 1). Se deposita una pequeña gota de sangre en uno de sus extremos, mediante una barrita de vidrio, palillo o del tubo capilar del microhematócrito. Se toma otro portaobjetos entre el dedo índice y el pulgar de la otra mano, éste actuará como extensor, por lo tanto deberá poseer un borde perfectamente regular. El extensor se coloca frente a la gota de sangre, formando un ángulo de aproximadamente 30°, se acerca hasta que la gota de sangre por acción capilar corra a lo largo del borde del extensor; en este momento conservando el mismo ángulo se hace correr el extensor y la sangre es extendida sobre el otro portaobjetos con regularidad. No debe ejercerse presión con el portaobjetos extensor, su mismo peso es suficiente.

Una vez extendida la sangre, el portaobjetos se agita al aire para que se seque el material.

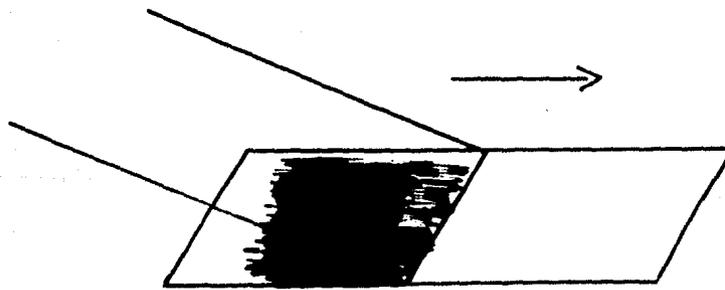
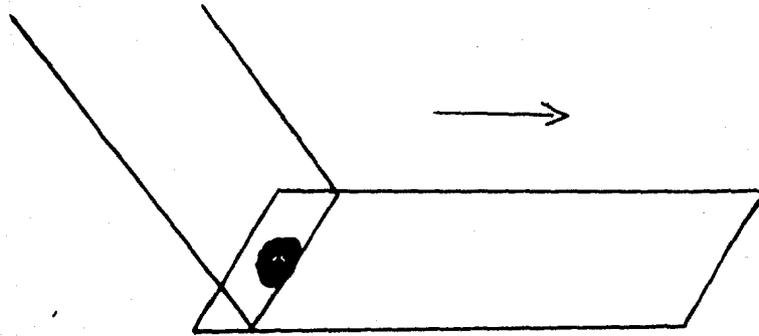
Una buena extensión deberá tener como aspecto ser gruesa en uno de sus extremos y desvanecida en el otro. Los lados deberán estar alejados de los del borde del cristal por lo menos unos 2 mm. La extensión debe tener aspecto regular y uniforme. Debe evitarse soplar sobre la preparación fresca o colocar cerca de un ventilador, ya que se puede causar la hémolisis de los eritrocitos.

- Técnica de extensión sanguínea en cubreobjetos.

Se efectúa cuando se requiere de más cuidado en la observación de los elementos celulares de la sangre. En este tipo de preparación los leucocitos se observan en mayor concentración y mejor distribuidos, en general hay mejor definición de los elementos.

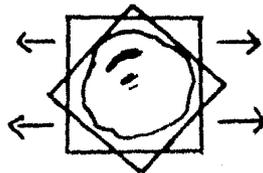
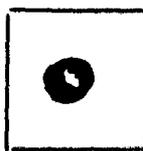
Los cubreobjetos deben estar perfectamente limpios y desengrasados (alcohol de 96°). Se emplean piezas de 22 mm. x 22 mm. y un grueso del No. 1. Sosteniendo el cubreobjetos con el dedo pulgar y el índice de una mano se deposita con la otra una pequeña gota de sangre en el centro. La gota debe ser lo bastante reducida para que en ningún caso llegue a los bordes del cubreobjetos al ser extendida. Se coloca el segundo cubreobjetos en posición diagonal sobre el primero, de tal manera que se forme una figura de una estrella de ocho puntas (Fig. 2), la sangre se extiende inmediatamente por capilaridad. Se sujeta el cubreobjetos superior por sus ángulos y se separa suavemente con un movimiento lateral.

DIAGRAMA DE TRES TECNICAS DIFERENTES DE EXTENSIONES DE SANGRE PARA
RA CONTEO LEUCOCITARIO DIFERENCIAL Y EXAMEN PARA HEMOPARASITOS .



A

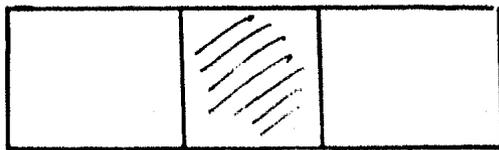
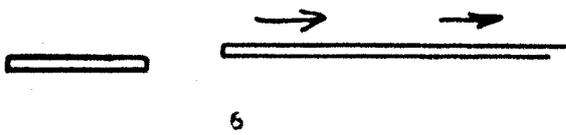
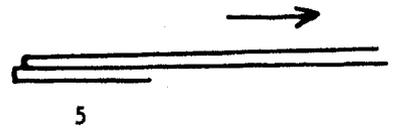
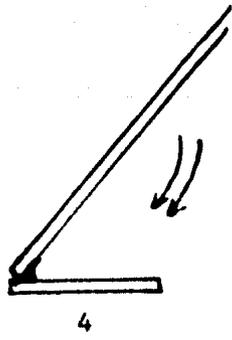
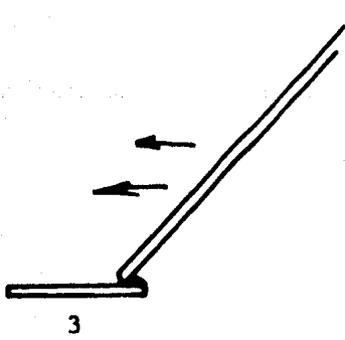
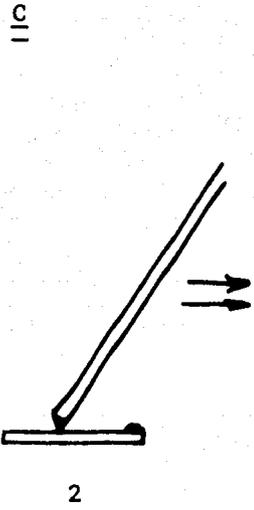
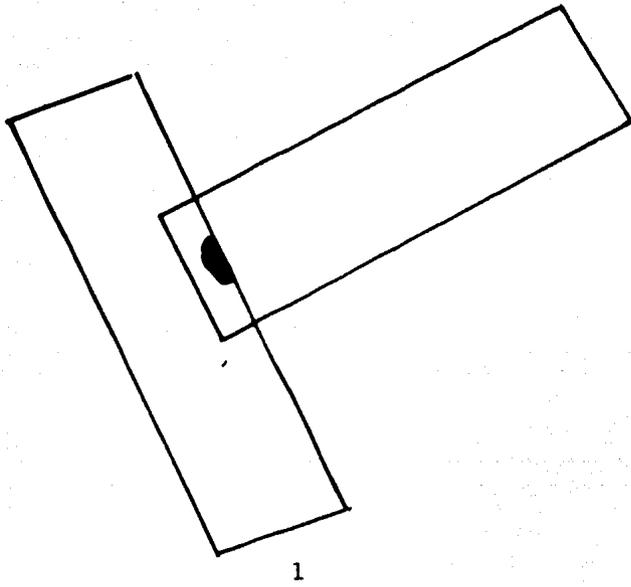
B



A Técnica del portaobjetos longitudinal.

B Técnica de los cubreobjetos.

C Técnica del portaobjetos transversal.



CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS.

Se examina el frotis con objetivo seco fuerte para tener una idea general del número de células, distribución, agregación celular y presencia de parásitos.

El resto de la observación se hace con el objetivo de inmersión.

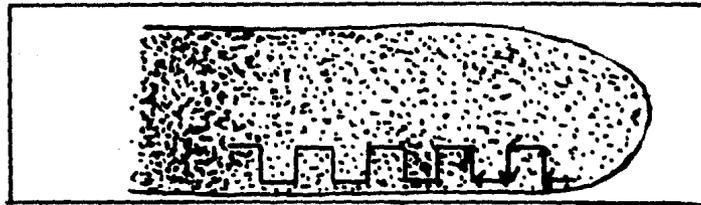
El examen debe comenzar por el lado fino de la preparación, se sigue una línea ondulada, con lo que se evita contar dos veces el mismo campo. (Fig. 1).

Se seleccionan los campos en los cuales los eritrocitos se encuentran bien separados, lo que indica que los leucocitos también tienen una buena separación.

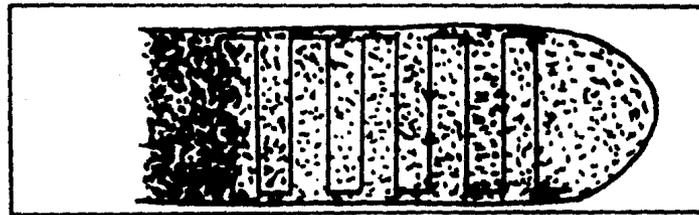
El conteo diferencial de leucocitos se hace contando un mínimo de 100 leucocitos por cada 10,000 de la cuenta total.

Si se descubre la presencia de elementos anormales, de células destruidas o se sospecha de alguna discrasia hemática el número que se cuenta es de un mínimo de 200 leucocitos.

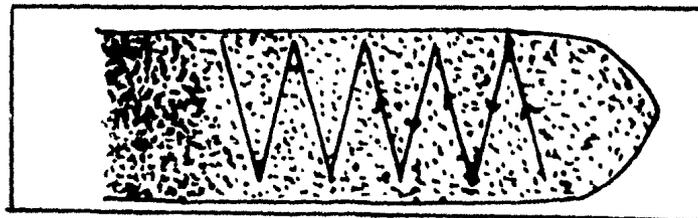
DIAGRAMA DE TRES DIFERENTES SISTEMAS PARA EFECTUAR EL CONTEO LEUCOCITARIO DIFERENCIAL.



Camino ondulante cerrado.

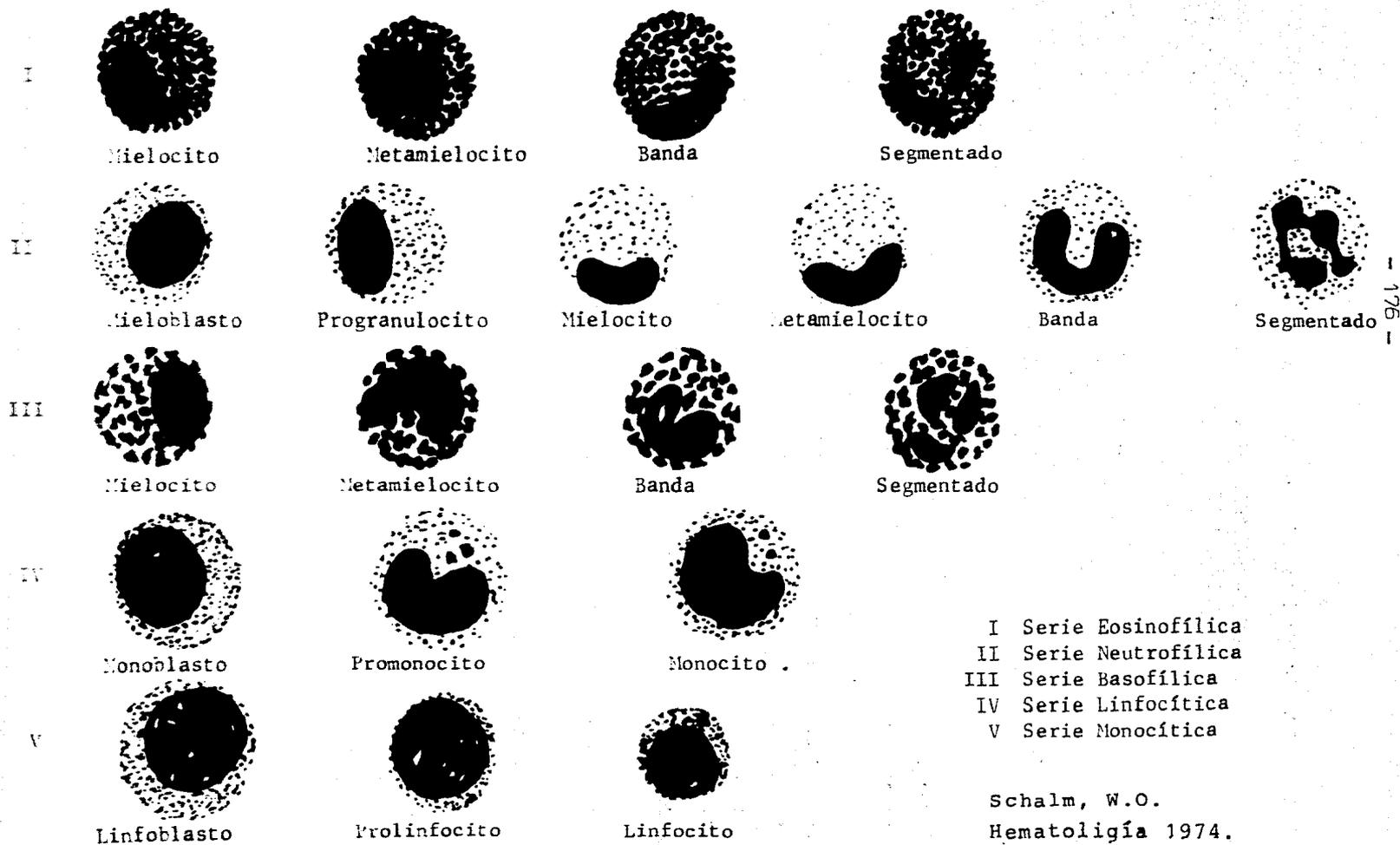


Camino ondulante abierto.



Camino transversal abierto

ESTADOS EVOLUTIVOS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE LEUCOCITOS.



I Serie Eosinofílica
 II Serie Neutrofílica
 III Serie Basofílica
 IV Serie Linfocítica
 V Serie Monocítica

Schalm, W.O.
 Hematología 1974.

VALORES NORMALES EN LA MORFOLOGIA SANGUINEA DE LOS BOVINOS.

Oscar W. Schalm
Veterinary Hematology.

	R A N G O	M E D I A
Hemoglobina	8.0 - 15.0	11.0
PVC	24.0 - 46.0	35.0
MCV	40.0 - 60.0	52.0
Eritrocitos	5.0 - 10.0 mill.	7.0 mill.
Leucocitos	4 000 - 12 000	8 000
Neutrofilos (banda)	0 - 120	20.0
Neutrofilos (maduros)	600 - 4 000	2 000
Linfocitos	2 500 - 7 500	4 500
Monocitos	25 - 840	400
Eosinófilos	0 - 2 400	700
Basófilos	0 - 200	500

Distribución de Leucocitos en porcentaje.

Neutrofilos (banda)	0 - 2.0	0.5
Neutrofilos (maduros)	15 - 45	28.0
Linfocitos	45 - 75	58.0
Monocitos	2 - 7	4.0
Eosinófilos	2 - 20	9.0
Basófilos	0 - 2	0.5

DETERMINACION DE HEMOGLOBINA.

Existen tres métodos para la determinación de hemoglobina:

1. Método de Shali (menos exacto)
2. Método de la Oxihemoglobina con el hemoglobinómetro de Spencer
3. Método de la Cianometahemoglobina, la cual requiere de un espectrofotómetro.

1. Método de Shali.

Se toman 20 mm^3 de sangre con la pipeta de Shali, se añaden 5 gotas de ácido clorhídrico al 0.1 N en un tubo especial. Antes de agregar la sangre al tubo se retiran los excesos de sangre de las paredes externas de la pipeta, una vez que se ha lavado la pipeta se lava tres veces con agua destilada y el producto de los lavados se deposita en la mezcla ácida de la sangre, después de cinco minutos se diluye la muestra poco a poco (de preferencia con una varilla de vidrio), hasta que el color en el tubo sea igual al de los dos tubos patrones que lo acompañan.

La raya en la que la graduación del tubo enrasa con la superficie del líquido indican en g/100 ml. de sangre la cantidad de hemoglobina.

Esta lectura se basa en el supuesto de que 14.5 g/100 ml. son el 100% de hemoglobina, este método tiene un error aproximado de más o menos el 15%.

2. Método del Hemoglobinómetro de Spencer.

Se coloca una gota de sangre en la plataforma del hemoglobinómetro, se mezcla perfectamente con un palillo el cual contiene saponina, esto aproximadamente durante un minuto, hasta que la hemólisis de la sangre sea completa. Se empuja la plataforma bajo el cubreobjetos. Se observa la cámara con luz transmitida, para ver que la gota cubra toda la plataforma y llene el espacio entre ésta y el cubreobjetos. El líquido debe tener un color rojo vino, ser transparente, no debe haber burbujas sobre el área de la plataforma. Se inserta el instrumento en la abrazadera y la cámara montada, se compara el color de la cámara con un prisma de vidrio que puede moverse en direcciones opuestas. Se forman dos campos verdes continuos, que deben de ajustarse hasta su igualación. Se deben obtener los valores de tres ajustes. El resultado se expresa en g/100 ml. de sangre.

El error es de más o menos el 5%. Los errores pueden deberse a:

- A. Mal mezclado de la muestra antes de llenar la cámara.
- B. Hemólisis incompleta, lo cual provoca lecturas altas.
- C. Errores del instrumento.

3. Método de la Cianometahemoglobina.

Es el método más recomendado, el espectrofotómetro o colorímetro debe ser normalizado por medio de una hemoglobina normal, la cual se encuentra en el comercio. Si no se sigue escrupulosamente la técnica, puede tenerse un error hasta del 2%.

PREPARACION DE SOLUCIONES, REACTIVOS Y COLORANTES

- Solución de Hayem - (Cuenta de eritrocitos)

- . Cloruro Mercurico 0.5 g.
- . Sulfato de Sodio 5.0 g.
- . Cloruro de Sodio 1.0 g.
- . Agua destilada 200 cc.

Filtrar periódicamente

- Solución de Gower - (cuenta de eritrocitos)

- . Sulfato de Sodio (Q.P. anhidro) 12.5 g.
- . Acido Acético Glacial 33.3 cc.
- . Agua destilada 200 cc.

- Solución de Acido Clorhídrico - (determinación de hemoglobina y cuenta de leucocitos)

- . Acido clorhídrico concentrado 1.0 cc.
- . Agua destilada 99 cc.

- Solución de Acido Acético Glacial - (cuenta de leucocitos)

- . Acido Acético Glacial 2.0 ml.
- . Agua destilada 100 ml.
- . Violeta de Genciana 1% en solución acuosa 1 ml.

- Colorante de Wright

- . Colorante de Wright en polvo (certificado) 0.1 mg.
- . Alcohol Metílico Absoluto (libre de acetona) 60 cc.

Filtrar y conservar en fras bien tapado por una semana con objeto de que madure.

- Colorante de Giemsa - (Solución madre)

- . Azur II eosina 3.0 gr.
- . Azur II 0.8 gr.
- . Glicerina q.p. 200 ml. (250 gr)
- . Alcohol metílico absoluto 312 ml. (250 gr)

Preparación:

En un matraz erlenmeyer, disolver el azur II eosina y al azur II en la glicerina, caliente a 60°C., agitando bien durante 15 minutos.

Agregar el alcohol metílico y agitar otros 10 minutos, se deja la solución en reposo en el matraz tapado, durante 24 horas.

Filtrar a través de papel de grado intermedio, descartando el residuo que queda en el papel, conservar el filtrado (solución madre) en frasco bien tapado.

- Colorante de Giemsa - (Dilución)

- . Colorante de Giemsa (Solución madre) 1 ml.
- . Agua Destilada 10 ml.

VII. QUIMICA SANGUINEA .

Q U I M I C A S A N G U I N E A .

INTRODUCCION.

La determinación de los componentes químicos de la sangre, son importantes des de el punto de vista clínico, ya que puede proporcionar un cuadro de los cambios patológicos y fisiológicos de un organismo por estar en contacto con todas las células del mismo.

La concentración de estos componentes en la matriz fluida de la sangre (suero y plasma) esta oscilando constantemente; estas oscilaciones relacionadas directamente con el estado de salud de las células.

En la interpretación de los análisis químicos de la sangre deberán tomarse en cuenta los siguientes puntos:

- 1). Estado fisiológico del animal.
- 2). Especie
- 3). Edad
- 4). Sexo
- 5). Lugar del cual fué tomada la muestra. La sangre arterial de una arteria a otra es casi la misma, pero la sangre venosa difiere de la sangre arterial, dependiendo de la actividad metabólica de la región drenada.
- 6). Deberá tomarse una muestra con anticoagulante y otra sin anticoagulante.
- 7). La composición de la sangre puede cambiar "in vitro" , dependiendo del tipo de anticoagulante usado.
- 8). Las valoraciones en el laboratorio deberán hacerse por duplicado para deter

minar la extensión de los errores intrínsecos los cuales varían de un método a otro. Métodos diferentes elaborados para la misma determinación, generalmente darán diferentes resultados.

VALORES NORMALES DE QUIMICA SANGUINEA EN BOVINOS.

J.J. Kaneko Lab. Pat. Clínica.
Universidad de California, Davis.

P R U E B A	R A N G O	M E D I A
Volúmen sanguíneo ml/kg.	57 - 63	65
Volúmen plasmático ml/Kg.	36 - 41	38.5
Volúmen de eritrocitos aglo- merados	24 - 43	35
pH	7.3 - 7.5	7.42
Gravedad específica en san- gre total	1.046 - 1.061	1.052
Plásma	1.023 - 1.029	1.027
Pruebas de coagulación:		
Tiempo de sangrado min.	1 - 5	
Tiempo de coagulación:		
Capilar min.	3 - 15	
Tubo min.	4 - 15	
Tiempo de protrombina seg.	18.5 - 27.5	23 ± 4.4
Fragilidad osmótica hemólisis inicial % Sol. Salina	0.62	
Hemólisis completa	0.48	
Potasio meq/L	3.9 - 5.8	4.8
Sodio meq/L	132 - 152	142
Proteína Total g/ 100 ml.	7.1 - 8.1	7.6 ± .5
Albumina g/ 100 ml.	3.1 - 3.7	3.4 ± .28
Calcio mg/ 100 ml.	9.7 - 12.4	11.0 ± .67
Cobre mg/ 100 ml.	32.8 - 35.2	
Ester mg/ 100 ml.	58 - 88	73.0 ± 15

VALORES NORMALES DE QUIMICA SANGUINEA EN BOVINOS.

P R U E B A		R A N G O	M E D I A
Colesterol Total	mg/ 100 ml.	80 - 120	
Nitrógeno úreico	mg/ 100 ml.	20 - 30	
Acido úrico	mg/ 100 ml.	0 - 2	
Bilirrubina total	mg/ 100 ml.	.01 - 0.47	0.21
Bilirrubina indi- recta	mg/ 100 ml.	.04 - 0.44	0.18
Transaminasa GO	Sigma Frankel	42 - 70	56 ± 14
Transaminasa GP	SF m/ ml.	8 - 24	16 ± 8
Cloro	meq/ L	97 - 111	104
Colesterol libre	mg/ 100 ml.	22 - 52	37 ± 15
Globulina	gm/ 100 ml.	3.7 - 4.4	
alfa 1		.8 - .9	.85 ± 0.6
beta		1.0 - 1.1	1.0 ± 0.5
gamma		1.9 - 2.4	2.16 ± 28
Glucosa	mg/ 100 ml.	30 - 60	

DETERMINACION DE CREATININA EN SUERO
(METODO JAFFE)

TUBOS	X	S	B
SUERO	0.2	-	-
ESTANDAR	-	0.2	-
AGUA	2.5	2.5	2.7
PICRATO ALCALINO	1.0	1.0	1.0

REPOSAR 15 MINUTOS .

LECTURA DE X y S CONTRA B a 490 nm.

REACTIVO

PICRATO ALCALINO :

ESTANDAR :
2 mg./ dl de Creatinina

CALCULO :
$$\frac{(D.O.) X}{(D.O.) S} \times 2mg./ dl = \text{Concentración de creatinina.}$$

CALCIO FERRO - HAM MODIFICADO

	X	S	B
SUERO	0.50 ml	-	-
ESTANDAR	-	0.50 ml.	-
AGUA DESTILADA	-	-	0.50 ml.
CLORANILATO DE SODIO	0.25 ml.	0.25 ml.	0.25 ml.
AGITAR	+	+	+
REPOSO 30' A TEMPERATURA AMBIENTE	+	+	+
CENTRIFUGACION 10' A 1800 rpm.	+	+	+
DECANTAR Y ESCURRIR	+	+	+
ALCOHOL ISOPROPIONICO	1.75 ml.	1.75 ml.	1.75 ml.
CENTRIFUGAR 10' A 1800 rpm.	+	+	+
DECANTAR Y ESCURRIR	+	+	+
AGUA DESTILADA	0.25 ml.	0.25 ml.	0.25 ml.
DESBARATAR EL PAQUETE	+	+	+
E D T A - NAY 50 %	0.50 ml.	0.50 ml.	0.50 ml.

LECTURA DE X y S

CONTRA B a 250 nm.

CALCULO :

$$\frac{(D.O.) X}{(D.O.) S} \times 10 = \text{mg/ dl.}$$

CÁLCIO (DIEHL)

	X	S
SUERO	0.05 ml.	-
ESTANDAR	-	0.05 ml.
KOH 1.25	0.25 ml.	0.25 ml.
CALCEINA	0.02 ml.	0.02 ml.

TITULAR CON E D T A 0.0008 M

BAJO LUZ ULTRAVIOLETA DE ONDA LARGA HASTA DESAPARICION DE FLUORESCENCIA.

$$\text{mg Ca \%} = \frac{\text{EDTA gastados en X}}{\text{EDTA GASTADOS EN S}} \times 10 = \text{mg Ca/dl.}$$

REACTIVOS.

HIDROXIDO DE POTASIO : disuelva 50 mg KCN puro en 100 ml. de KOH 1.25 N ,
almacene en botella oscura.

CALCEINA : disuelva 25.0 mg de calceina en NaOH 0.25 N , hasta hacer 100 ml.
almacene en botella oscura.

E D T A : pesar 290 mg de EDTA y llenar a 1000 ml. con agua destilada.

COLINESTERASA

	<u>Muestra Normal</u>	<u>Muestra Desconocida</u>
Azul de Bromotimal		
al 0.0135%	1.0 ml.	1.0 ml.
NaCl al 0.85%	2.4 ml.	2.4 ml.
Acetil colina Roche	3 gotas	3 gotas

Leer contra agua a 600 nm. a 0' y 20'
incubando en baño de agua a 37°C

$$\text{Ec. 1 - } \frac{A_{0'}}{A_{20}} = \frac{AA}{Ao'}$$

$$\text{Ec. 2 - } \frac{(AA / Ao') \text{ Desconocido}}{(AA / Ao') \text{ muestra normal}} \times 100 = \% \text{ de actividad de colinesterasa}$$

BILIRRUBINA (MERCKOTEST)

TECNICA :

BILIRRUBINA DE REACCION DIRECTA.

	X	B
ACIDO SULFANILICO	0.2 ml.	0.2 ml.
NITRITO DE SODIO	0.02 ml.	-
SOLUCION FISIOLÓGICA DE Na Cl	2.0 ml.	2.0 ml.
SUERO	0.2 ml.	0.2 ml.

Mezclar al momento y dejar en reposo a temperatura ambiente y comparar a los 5 minutos EXACTAMENTE DESPUES DE AGREGAR EL SUERO, las extinciones de la muestra y el blanco.

CALCULO :

Contenido de bilirrubina directa = $E \times 14.6 \text{ mg}/100 \text{ ml.}$

NORMAL EN BOVINOS: 0.0 - 0.03 mg/100 ml.

BILIRRUBINA (MERCOTEST)

TECNICA:

BILIRRUBINA TOTAL.

Solo con sueros turbios se necesita muestra en blanco.

	X	B
ACIDO SULFANILICO	0.2 ml.	0.2 ml.
NITRITO DE SODIO	0.02 ml.	-
ACTIVADOR	1.0 ml.	1.0 ml.
SUERO	0.2 ml	0.2 ml.

Mezclar y dejar 10 a 60 minutos en reposo a temperatura de 20 - 30°C.

SOLUCION DE FEHLING II	1.0 ml.	1.0 ml.
------------------------	---------	---------

Mezclar y al cabo de 5 - 30 minutos, comparar la extinción con agua destilada, o en su caso, con la muestra en blanco.

En extinciones de más de 1.0, diluir el suero 1-4 con solución fisiológica de cloruro de sodio; multiplicar por 5 el resultado.

CALCULO :

BILIRRUBINA TOTAL = (E - 0.015) x 11.3 mg/100ml.
o bien, comparando con una muestra en blanco:
BILIRRUBINA TOTAL = E x 11.3 mg./100 ml.

NORMAL EN BOVINOS : 0.01 - 0.47 (0.21) mg/100 ml.

DETERMINACION DE BILURRIBINA DIRECTA

	X	B	S
SUERO ml	0.1	0.1	-
ESTANDAR	-	-	0.1
MEZCLAR	+	+	+
ACIDO SULFANILICO 0.1%	-	0.3	-
DIAZO REACTIVO	0.3	-	0.3

REPOSO 30' T.A.

LECTURA X Y S CONTRA B a 540 nm

CALCULO:

$\frac{D.O.X.}{D.O.S.} \times 2.5 = \text{mg DE BILIRUBINA INDIRECTA /dl}$

D.O.S.

BILURUBINA DIRECTA mg dl = BILIRRUBINA INDIRECTA

BILIRRUBINA TOTAL Y CONJUGADA

	X	B	S
SUERO ml	0.1	0.1	-
AGUA DESTILADA	1.0	1.0	-
AC SULFAMILICO	-	1.0	-
REACTIVO DIAZO ml	1.0	-	-
ESTANDAR ml	-	-	2.0

REPOSO 5' A TEMPERATURA AMBIENTE

CALCULO

$$B. DIRECTA = \frac{D.O. "X"}{D.O. "S"} \times 2.5 = \text{mg/dl}$$

	"X"	"B"
METANOL	5.0	5.0

REPOSO 30' A TEMPERATURA AMBIENTE

LECTURA "X Y "S" CONTRA "B" A 540 nm

CALCULO

$$B. TOTAL = \frac{D.O. "X"}{D.O. "S"} \times 50 = \text{mg / dl}$$

REACTIVOS:

1 METANOL RA FRESCO

2 REACTIVO DIAZO: MEZCLAR 0.3 ml. DE NITRITO DE SODIO AL 0.5% +

10 ml. DE AC SULFANILICO AL 0.1%

FOSFORO INORGANICO (HYCEL)

Reactivos

Molibdato de amonio	0.19 % (P/p)
Sulfato amónico ferroso	0.39 % (P/p)
H ₂ SO ₄	5.32 % (P/p)
Eter polioxietileno	1.45 % (P/p)

PROCEDIMIENTO

	X	S	B
Reactivo ml	6.0	6.0	6.0
Suero	0.2	-	-
Estandar	-	0.2	-
H ₂ O dest.	-	-	0.2
Mezclar	+	+	+
Reposo T.A 30'	+	+	+

Lectura x. y 5 contra B a 655 nm

Cálculo $\frac{DO \text{ "X"}}{DO \text{ "S"}} \times 8 \text{ mg} = \text{mg/dl}$

DO "X"

DEMOSTRACION DE TGPS

	X	B
Reactivo 3 Substrato TGP	0.5	0.5
Incubar 5' - 37° C	-	-
Suero	0.1	-
Agua	-	0.1
Incubar 30' - 37° C	-	-
Reactivo 2 (Desarrollador color)	0.5	0.5
Reposo 20' Temperatura ambiente	-	-
Na OH 0.4 N	5.0	5.0

Lectura X contra B a 505 nm % T

Cálculo : Leer % T contra unidades en curva.

DETERMINACION DE TGOS .

	X	B
- Reactivo 1 Sustrato ml.	0.5	0.5
Incubación 5' - 37° C		
Agua	-	0.1
Suero	0.1	-
Incubación 60' - 37° C		
Reactivo 2 (Desarrollador de color)	0.5	0.5
Reposo 20' Temperatura ambiente		
Na OH 0.4 N	5.0	5.0

Lectura de X contra B a 505 nm en % T

Cálculo : leer % T en curva contra unidades en curva Reifman Frankel.

DETERMINACION DE UREA (DAM)

	X	S	B	
Suero	0.02	-	-	ml.
Agua	-	-	0.02	ml.
Standar	-	0.02	-	ml.
Catalizador	0.2	0.2	0.2	ml.
D.A.M.	0.2	0.2	0.2	ml.
Incubar a 100°C por 6 minutos				
Agua	2.0	2.0	2.0	ml.

Lectura a 520 nm.

Cálculo :

$$\frac{(D.O.) X}{(D.O.) S} \times C (S) = \text{mg \%}$$

Solución Patron de Urea : 40 mg/ 100 ml.

DETERMINACION DE DESHIDROGENASA DE SORBITOL SERICA

Tubos	X	B
BUFFER TRIS	2.3	2.6 ml
NADHR	0.2	0.2 ml
PLASMA O SUERO	0.2	0.2 ml
INCUBAR 10 MINUTOS A 25	-	-
FRUCTUOSA	0.3	-

Leer a 340 nm. la D. Optica de X contra el blanco cada minuto durante 5 ó 7 minutos.

Cálculo: Sumas de las diferencias en 5' de D.O. = A.D.0/MIN X

V.I. de DHS/ 2410 = VI/min/1.

REACTIVOS

1. Buffer trs. - 0.05 M pH = 7.4
pesar 6.057 gr/lt aforar con agua hasta casi 1 litro ajustar al pH a 7.4
2. Fructuosa 3.3 m
pesar 5.9 gr de D-fructuosa y aforar a 10 ml con agua guardar en refrige
ración.
3. Sol. NaOH 0.01 N - hacer 100ml de NaOH 0.1 N tomar 10 ml y 90 ml de
H2O dest.
4. NADH2 - Disolver 1 mg de NADH2 en 1 ml de NaOH 0.01 N (Sol. 3)

BOVINO: 0.5 .14

DETERMINACION DE CLORUROS EN SUERO O PLASMA

(método Richtench)

Tubos	X	S	B
Acido sulfúrico	2.0	2.0	2.0
Suero	0.02	-	-
Agua destilada	-	-	0.02
Estandar	-	0.02	-
Reactivo	1.0	1.0	1.0

Agítese por tres segundos y centrifugue por 10 min. a 1.200 rpm lea la absorbancia o densidad optica del sobrenadante a 500 nm. contra el blanco.

Cálculo: $m \text{ Eq/ l} = \frac{\text{D.O. X}}{\text{D.O.S.}} \times 100$

Reactivos:

Acido sulfúrico: 0.1 N

Estandar: Pesar 7.455 g de Cloruro de Potasio y disolver en agua destilada a un litro. Guardar en congelación; tiene 100 meq/lt. 0.1N

Reactivo de cloruros; pesar 1.0 g de Cloramilato de Mercurio y suspenderlo en 100 ml. de H2SO4 0.1N

Agitar bien antes de usarlo

DETERMINACION DE GLUCOSA (por Orto-Toluidina).

	X	S	B	
Reactivo	2.0	2.0	2.0	ml.
Plasma o Suero	0.02	-	-	ml.
Estandar	-	0.02	-	ml.

Incubar 5 min. - 100° C

Leer a 650 nm X y S contra B

Cálculo : $\frac{(D.O.) X}{(D.O.) S} \times 100 = \text{Glucosa mg/dl}$

Reactivos :

1. Reactivo de Orto - Toluidina

En un matraz aforado de 1000 ml. poner 2 gr. de Tiourea, 60 ml de agua, 60 ml. de orto - toluidina y 300 ml. de ácido acético glacial, agitar hasta disolver y aforar a 1000 ml. con ácido ácetico glacial.

2. Estandar

Pesar 1.0 gr. de glucosa y 1.0 gr. de ácido benzóico, aforar a 1000 ml. con agua destilada, este estandar contiene 100 mg/dl.

FOSFORO INORGANICO - ITAYA

1. Tween 20 1.5%

Reactivos 2. Molibato de amonio 4.2% en HCL 5.0 N

(422 ml de HCL cbp 1000 ml de H₂O destilada)

3. Verde de malaquita 0.2%

Reactivo desarrollador de color. 1 volumen de molidbato de amonio, y 3 volúmenes de verde de malaquita, dejar reposar 30': filtrar antes de usar

Procedimiento:

	X	B	S
1. Reactivo desarrollador ml de color	5.0	5.0	5.0
2. Tween 1.5% ml	0.2	0.2	0.2
3. Suero ml	0.02	-	-
4. Agua desmineralizada	-	0.02	
5. Estandar	-	-	0.02
6. Reposo 15 minutos	X	X	X
7. Lectura de X y S contra B a 660 nm			
8. Cálculo			

$$\frac{D O X}{D.O.S.} \times 8.0 = \text{mg/dl}$$

PROTEINAS TOTALES (METODO BIRUET) (RICHTERICH)

Reactivos:

Solución de almacenamiento: 4.5 g de tartrato de sodio y potasio se disuelven en 40 ml de hidróxido de sodio al 0.2 N y más tarde 1.5 g de sulfato de cobre es añadido con movimiento vigoroso, luego 0.5 de ioduro de potasio es añadido a la mezcla y esta se diluye a 100 ml con una solución de Hidróxido de sodio al 0.2 H.

Solución de Dilución: 5 g de ioduro de potasio se disuelven en una solución de Hidróxido de sodio al 0.2 N hasta formar 1 litro.

Reactivo de Biureto: 20.0 ml de la solución de almacenamiento es diluida a 100 ml con la solución de dilución. Estable unas 4 semanas.

Estandar: Se puede adquirir uno comercial.

Procedimiento:

	T	TB	RB	S
Reactivo de Biureto ml.	1.0	-	1.0	1.0
NaCl al 0.9% ml	-	1.0	0.02	-
Suero o Plasma ml	0.02	0.02	-	-
Estandar ml	-	-	-	0.02

Esperar 30 minutos y leer la extinción contra agua a 546 nm.

Cálculo :

$$\text{Proteína} = \frac{A(T) - A(TB) - A(RB)}{a(S) - A(RB)} \times c(S) \text{ g/100 ml}$$

T = Test

RB = Reactivo + Blanco

TB = Tubo Blanco

S = Standar

FOSFATASA ALCALINA (HYVEL)

Especificidad de la reacción.

Es para la actividad de la FAS en suero, la reacción puede alterarse con elevación de la cantidad si existe hemólisis o si se deja el suero a temperatura ambiente por mucho tiempo. Puede alterarse con una baja de la cantidad si se usó EDTA, oxalato, fluoruro.

Técnica	X	S	B
Sustrato (ml)	4.0	4.0	4.0
Incubar por 5 min. a 37°C			
Estandar de Tymoftaleína(ml) -		0.1	-
Suero (ml)	0.1	-	-
Mezclar el tubo X y B vigorosamente y regresar a la incubación rápidamente por 10 min. a 37°C			
Alcali (ml)	2.0	2.0	2.0
Agua	-	-	0.1

Cálculo.

Lectura a 590 nm, contra el reactivo solo + H₂) (B)

$$\frac{D.O. X}{D.O. S} \times 70 = U.I. \quad \frac{U.I}{7.75} = U.B.$$

Reactivos

Sustrato; Monofosfato de timolftaleína 0.58% en 0.25 m de amortiguador de 3-propandiol-HCL
 Estandar; 0.030% C₂₈H₃₀O₄ en 93.5% CH₂ (CH₂)₂OH
 Reactivo; 0.4% NaOH en 2.5% NaCO₃

Niveles

Normales

Equino 6 - 22 U.B./ml
 Bovino 3 - 114 U.B./ml
 Ovino 14 - 427 U.B./ml
 Porcino
 Canino 0 - 4 U.B./ml
 Felino 0 - 7.1 U.B./ml

GLUCO OXIDASA.

	X	S	B	
Solución de trabajo	2.0	2.0	2.0	ml.
Suero	0.04	-	-	ml.
Standar	-	0.04	-	ml.
H ₂ O	-	-	0.04	ml.
Reposo 30' Temperatura ambiente				
Acido Sulfurico 9.3 N	2.0	2.0	2.0	ml.

Lectura X y S contra B a 510 nm.

Cálculo :

$$\frac{X}{S} \times c(s) = \text{mg \%}$$

Reactivos :

Glucostat (Worthington Biochemicals)
Disolver el cromógeno y glucostat en 100 ml. de agua y 100 ml.
de glicerol (solución madre).

Solución de trabajo;
una parte de solución madre y una de Trietanolamina.

Trietanolamina 9.28 g

HCl 2 M 15 ml.

Agua csp 1000 ml.

Acido Sulfurico 9.3 N : 64 ml. de ácido sulfurico concentrado
en 36 ml. de agua y completar a 100 ml.

HCl 2M : 180 ml. de HCl al 36% en agua csp 1000 ml.

VIII. TOXICOLOGIA .

DIAGNOSTICO DE INTOXICACION.

Para llegar al diagnóstico de una intoxicación deberán tomarse en cuenta los siguientes pasos:

- a). Obtención de la historia clínica completa. Esta deberá contener la siguiente información básica:
 - 1). Confiabilidad del material obtenido: naturaleza y origen del tóxico.
 - 2). Acceso del animal al material tóxico.
 - 3). Cantidad suficiente de material para causar signos clínicos o la muerte.
 - 4). Evidencia de que la planta fué ingerida, en caso de intoxicación por plantas.

- b). Exámen Clínico. En la realización del exámen clínico deberan tomarse en cuenta las siguientes observaciones:
 - 1). Hay pocos signos patognomónicos de intoxicación.
 - 2). Es importante un exámen sistemático.En cuanto a los signos generales de intoxicación se presentan:
 - anorexia
 - deshidratación
 - depresión
 - emaciación
 - disnea
 - muerte rápida

- 3). Los sistemas más comunmente afectados son:
 - Sistema Nervioso Central, en el cual se observan convulsiones, parálisis, temblores musculares, movimientos o posiciones anormales e hiperexcitabilidad.
 - Aparato Digestivo, en este se presentan : vómito, diarrea, constipación cólica, lesiones en el hígado (ictericia y alteraciones del funcionamiento hepático).
 - Aparato Cardio Vascular, hay cardioglicolisis y daño en los vasos.
 - Sistema Hematopoyético, se presenta destrucción de la médula ósea (benceno), metahemoglobinemia.
 - Sistema Urinario, hay uremia.

- c). Exámen Patológico.

Raramente se encuentran signos patognomónicos, aunque debe hacerse para eliminar la probabilidad de otras causas de muerte, algunas lesiones son muy sugestivas las que asociadas con otros hallazgos pueden arrojar un diagnóstico. En este exámen deben detectarse ciertos olores o colores de los tejidos; por otra parte si no se encuentra una lesión específica, esto no significa que no pudo haber intoxicación.

PRINCIPIOS GENERALES EN LA RECOLECCION DE MUESTRAS.

- 1). Se debe tener una idea de lo que se va a analizar.
- 2). Obtener muestras adecuadas de los tejidos de acuerdo al agente sospechoso. Tomar una muestra representativa.
- 3). Obtener suficiente material. El material deberá mantenerse en congelación ó

T O X I C O L O G I A .

I N T R O D U C C I O N .

Intoxicación:

Estado de enfermedad causado por cualquier sustancia o material (sólido, líquido o gas) que aplicados exteriormente al cuerpo o de cualquier manera introducidos a él, pueden causar destrucción de la vida, por medio de -- sus cualidades inherentes.

Las intoxicaciones pueden ser de dos tipos:

- a). Crónicas. Generalmente son subclínicas.
- b). Agudas. Pueden no ser visibles clínicamente por la rapidez con que se presenta la muerte.

Acción de los Tóxicos.

Los tóxicos pueden tener acción sobre diferentes sistemas y tejidos:

- a). Pueden causar lesión local de los tejidos debido a:
 - acidez
 - alcalinidad
 - metales pesados
- b). Necrosis de las células epiteliales:
Esta puede ser causada por cierto tipo de plantas tóxicas (alcaloides de la pirrolizidina) y por efecto de las alteraciones mencionadas en el grupo anterior, en concentraciones bajas.
- c). Pueden causar efectos en el funcionamiento del Sistema Nervioso Central, sin lesiones del mismo como en el caso de intoxicación con estriquina, ácido -- cianhídrico y la cicuta.
- d). Las lesiones en sangre y sistema vascular principalmente son hemólisis, alteraciones de médula ósea, lesiones en el endotelio vascular y alteraciones en la oxigenación de la sangre.
- e). La acción que tienen sobre el sistema enzimático, es probablemente uno de -- los más importantes métodos de acción, atacan principalmente a los grupos -- sulfhídrico, a la colinesterasa y al sistema citocromo-oxidasa, esto depen -- diendo del tipo del tóxico.

Otros factores que afectan la acción de los tóxicos son:

- a). Dosis. Relacionado comunmente con la talla del animal.
- b). Naturaleza física y química del tóxico.
- c). Origen del tóxico.
- d). Exposición única o repetida.
- e). Especie. Se tomaran en cuenta las variaciones anatómicas y fisiológicas.
- f). Edad del animal.
- g). Sexo. Existe susceptibilidad de acuerdo a esta característica.
- h). Estado de salud del animal.
- i). Exposición a otros agentes tóxicos o drogas.

refrigeración hasta que sea recibido en el laboratorio. Tomar en cuenta los días festivos y fines de semana.

- 4). Uso de recipientes adecuados: que no se perforen, inherentes químicamente. Poner cada tejido o muestra en recipientes separados, sellar cada recipiente.
- 5). Identificación correcta de los especímenes.
- 6). Llevar el material directamente al laboratorio si es posible.
- 7). Todas las muestras entregadas al laboratorio deben ir acompañadas de:
 - a). Historia completa, cuadro sintomatológico y patológico.
 - b). Especificación de que tipo de tóxico se desea que se busque.
 - c). Se debe mencionar si se realiza una acción legal con estas.

ESPECIMENES SUGERIDOS PARA EXAMENES TOXICOLÓGICOS.

<u>Tóxico</u>	<u>Muestra requerida en orden de importancia</u>
Arsénico (agudo)	higado, riñones, contenido estomacal, estomago.
Arsénico (crónico)	cabello, orina e higado
Tetracloruro de <u>carb</u> bono	contenido estomacal y vísceras parenquimatosas.
Queroseno	contenido ruminal, higado, y porciones de intesti- no delgado
Plomo	riñones, higado, sangre y contenido estomacal.
Mércurio	riñones, higado y contenido estomacal.
Acidos y alcalis minerales	estomago y contenido, higado, riñones y orina.
Selenio	higado, riñones y pelo.
Cloruro de sodio	plasma ó suero, contenido estomacal.
Nitrato de sodio	estomago y contenido, higado y orina.
Estricnina	estomago y contenido, higado y orina.
Urea	sangre completa u oxalatada, alimento.

Se recomienda enviar más de una muestra al laboratorio para cada determinación.

CANTIDADES DE MUESTRA SUGERIDAS PARA EXAMEN TOXICOLOGICO.

<u>Muestra</u>	<u>Cantidad mínima requerida.</u>
Sangre	10 a 30 c.c.
Hueso	25 gramos
Alimento	500 gramos a 2.5 kilos
Pelo	5 gramos
Riñones	2 riñones
Hígado	animales grandes 1 Kg. animales pequeños todo el material disponible
Plasma ó suero	10 c.c.
Contenido estomacal	animales grandes 1 Kg. animales pequeños todo el material disponible
Orina	todo el material disponible (500 c.c.)

A R S E N I C O .

Reacción de Reinsch. (arsénico y otros metales pesados)

Muestra: materias fecales ó hígado.

25 gramos de muestra en un matraz

10 ml. de ácido clorhídrico concentrado

90 ml. de agua destilada (ó en una relación de 1 a 4 de ácido y agua)

Se deposita un trozo de alambre de cobre, la mezcla se hierve a fuego lento de 15 a 30 minutos, la pieza de cobre se lava y se seca.

Resultado: Un depósito negro u obscuro en la pieza de cobre, hace suponer la presencia de metales pesados como arsénico, antimonio, mercurio ó plata.

Prueba negativa: color vivo de cobre o rojizo.

Prueba de Gutzeit. (arsénico)

Se hace una destrucción de la materia porⁿ vía húmeda, usando HNO_3 , H_2SO_4 y HCl_4 .

El líquido claro proveniente del proceso anterior se coloca en el congelador, con el fin de congelar la grasa. Se filtra.

Se colocan aproximadamente 10 ml. del filtrado en el generador de arsénico.

Se añaden 5 ml. de solución de yoduro de potasio al 15 % y 4 gotas de solución de cloruro estañoso.

Dejar el conjunto en reposo en el congelador durante 15 minutos.

Preparar de 5 a 10 granallas de zinc en un vaso de precipitados, añadiéndole ácido clorhídrico al 10 % y unas gotas de solución de cloruro estañoso. El depósito de estaño sobre la superficie de las bandas de zinc las activa. Se lavan luego con agua.

Se añaden las granallas de zinc a la solución y se tapa con la parte superior del aparato, que tiene una gasa impregnada con solución de acetato de plomo y un trozo de papel impregnado con solución de bromuro de mercurio que indica la presencia de arsénico en la muestra.

Material:

- ácido nítrico concentrado
- ácido sulfúrico concentrado
- ácido clorhídrico concentrado
- ácido perclórico
- granallas de zinc, excentas de arsénico
- solución de cloruro estañoso, Disolver 40 gr. de cloruro estañoso en 100 ml. de ácido clorhídrico.
- solución de acetato de plomo al 9.59 %
- solución de yoduro de potasio al 15 %
- papel de bromuro de mercurio al 2,5 % en alcohol 95 %

P L O M O.

Prueba de Greenwald. (plomo en tejidos, estomago, hígado y riñón)

Se realiza un raspado de la pared del estomago ó se pica una pequeña porción de corteza de tejido renal, aproximadamente 1 cm² .

Se coloca el tejido en un pequeño matraz y se añaden unas gotas de ácido nítrico concentrado, se calienta o se expone al aire hasta la sequedad completa.

Se añaden de 8 a 10 gotas de agua.

Se añaden 2 gotas de una solución de yoduro de potasio al 10%¹.

Resultados:

Positivo si hay una fuerte coloración amarilla.

Negativo sin cambio.

C I A N U R O .

Prueba del Acido Pítrico. (estomago, contenido ruminal y vegetales)

Reactivo:

Bicarbonato sódico	0.5 g
Acido Picrico	0.5 g
Agua	100 ml.

Se impregna una tira de papel filtro en la solución.

Las materias sospechosas se trituran y se mezclan con agua. Este material se deposita en un frasco que no debe quedar llano más de una cuarta parte: se añaden de 5 a 10 gotas de cloroformo.

Se fija el papel reactivo en la embocadura del frasco y se pone el conjunto en la incubadora o en un lugar caliente.

Resultado:

El gas cianhídrico hace virar el papel a un color violeta intenso.

Sí las cantidades de cianuro son pequeñas, el color será rosado ó rojo.

Negativo. El papel reactivo no presenta cambios.

N I T R A T O S .

Prueba de Campo Cualitativa.

Reactivos:

Difenilalanina 0.5 g.

Agua destilada 20 cc.

Acido Sulfúrico hasta completar 100 ml.

La difenilalanina se disuelve en los 20 cc. de agua destilada. Se adiciona ácido sulfúrico hasta completar 100 ml. La solución se vierte y se guarda en un recipiente color ambar, esta es una solución saturada. Para una solución medio saturada se ponen partes iguales de la primera solución y se adiciona ácido sulfúrico al 80%.

Prueba en el material sospechoso: se coloca una gota en la superficie de corte de la planta.

Resultados: sí el rango de coloración es del verde al azul, se considera positivo. La reacción del verde al azul con una solución medio saturada, indica la presencia de 2% de nitratos, por lo tanto hay posibilidades de que el alimento sea peligroso. Negativo, si no se presenta cambio de coloración.

N I T R I T O S .

Prueba de Campo Cualitativa.

Para esta prueba son necesarios 2 reactivos:

Solución I

Se disuelven 0.5 g. de ácido sulfánilico en 150 cc. de ácido acético glacial al 20%.

Solución II

Se disuelve (por ebullición) 0.2 g de hidrocloreuro de alfa-naftilamina en ácido acético glacial al 20%.

Prueba: se colocan 2 c.c. de una substancia desconocida en un tubo de ensaye limpio, se añaden primero 2c.c. de la solución de ácido sulfanílico y después 2c.c. de la alfa-naftilamina (control : sin cambio)

En el tallo de maíz forrajero agregue de 3 a 4 gotas de la solución I a un corte que se haga en la corteza, luego adicione 3 a 4 gotas de la solución II.

Resultados:

Positiva, sí la coloración va del rosa al rojo.

Negativa, sin cambio.

IX. ESTERILIZACION DE MATERIAL .

ESTERILIZACION DE MATERIAL

PREPARACION DEL MATERIAL A ESTERILIZAR

El material a esterilizar deberá ser preparado de acuerdo a la utilidad que se le vaya a dar, o dependiendo del tipo de material de que se trate, así tenemos:

Los medios de cultivo serán preparados en matraces (Erlenmeyer, redondos, etc.), y de acuerdo a las instrucciones del fabricante, las cuales por lo general se encuentran impresas en la caja o frasco, en estas se incluyen las indicaciones en cuanto a cantidad de medio deshidratado, mililitros de agua bidestilada para su dilución y constantes de esterilización, las cuales son generalmente uniformes para la mayoría de los medios. Los medios de cultivo deberán ser esterilizados por medio de presión de vapor y temperatura (autoclave), esto para evitar la ebullición, desecación o alteraciones en los diversos componentes de los medios.

Material de cristalería. Se incluyen cajas de petri, pipetas, probetas, tubos de ensaye (con y sin tapón de baquelita), frascos, matraces y agitadores de vidrio.

Las cajas de petri serán depositadas en un porta cajas (metálicas) ó envueltas en papel manila ó papel revolución, esto último en grupos no mayores de 4 cajas, con el fin de evitar se contaminen varias cajas al abrir los paquetes. Se utilizará la esterilización por calor seco (horno Pasteur) la cual es la más eficaz en este tipo de material, pudiéndose usar la esterilización en la autoclave.

Pipetas. Se tapan en un extremo superior con una torunda de algodón, la cual deberá ser introducida con una presión que permita la succión de los materiales sin ninguna dificultad, el exceso del algodón se elimina por flameado, seguidamente se depositan en un porta pipeta (metálicos) o se envuelven en papel manila, indicando la graduación correspondiente. La esterilización se realiza por medio de calor seco o en el autoclave.

Tubos de ensaye (con o sin tapón), frascos, matraces, agitadores, instrumental (tijeras, pinzas, espátulas, bisturí, etc.).

Los tubos de ensaye sin rosca, pueden tapados con torundas de algodón o tapones de hule, los tubos con tapón de baquelita se cierran con fuerza, pero sin mucha presión. Se colocan en cestillas de alambre o se hacen paquetes pequeños con papel manila. Se esterilizan en el autoclave. Para los frascos se siguen las mismas indicaciones.

Matraces. Si los matraces no tienen tapón de rosca, se hace un tapón con gasa y algodón, el cual quede suficientemente presionado y resista el peso del matraz vacío al levantarlo. Se esterilizan por medio de calor húmedo (autoclave)

Instrumental y agitadores. Se envuelven individualmente o por paquetes en papel manila, de acuerdo a su empleo, se esterilizan en el autoclave.

PROCESO DE ESTERILIZACION.

Se puede realizar a través de las siguientes formas:

- Calor húmedo (autoclave)
- Calor seco (horno)
- Flameado directo (mechero)

Esterilización por calor húmedo. Se realiza por medio de tres factores:

Temperatura, presión de vapor y tiempo.

Se llena de agua el autoclave hasta el nivel indicado, se introduce el material a esterilizar y se cierra la tapa herméticamente para evitar fugas de vapor, se deja abierta la válvula, la cual se encuentra generalmente en la parte superior junto con el manómetro, se aplica la fuente de calor (llama o electricidad). Se deja purgar (término que se aplica a la salida constante de vapor, lo cual indica que este ha desplazado el aire contenido en el interior, este se alcanza entre las 3 y 5 lbs. de presión) y se cierra la válvula, a partir de lo cual la presión y la temperatura empiezan a ascender, en el momento en que el manómetro indique 15 lbs. de presión la temperatura es de 121°C., constantes a las cuales se debe mantener durante 15 minutos. Esto se controla regulando las fuentes de calor en algunos modelos y en otros sucede de manera automática. Es importante que las constantes se mantengan, ya que si se ven disminuidas cualquiera de las tres, la esterilización no es efectiva.

Precaución. La tapa no deberá ser retirada hasta que la presión indicada en el manómetro sea de cero, se abre la válvula y se libera la presión que haya quedado.

ESTERILIZACION POR CALOR SECO.

Esta se realiza en el horno Pasteur, el cual posee una fuente de calor eléctrica a través de una serie de resistencias.

Se introduce el material a esterilizar en el horno, se cierra perfectamente la puerta, se acciona el interruptor y se verifica que la temperatura ascienda a 160°C., se mantiene esta temperatura por un mínimo de 60 minutos. La temperatura se revisa constantemente con un termómetro el que se introduce en un orificio que se encuentra en la parte superior. Existen otros modelos que regulan el calor automáticamente, pero también es necesario revisar su correcto funcionamiento por medio de lecturas periódicas con el termómetro.

ESTERILIZACION A LA FLAMA

Esta se realiza en el instrumental para toma de muestras, boquillas de frascos y matraces, llaves para toma de agua, asas bacteriológicas, etc. en el momento de tomar las diferentes muestras.

En el caso del flameado de instrumental se deberá contar con un recipiente el cual contenga alcohol, dentro del cual se deposita el instrumental, se retira del recipiente y se coloca en la flama del mechero, dejando que el alcohol adherido se consuma, se permite que la temperatura disminuya antes de ser utilizado, con el fin de no causar la muerte de los microorganismos a muestrear en el caso de muestras para siembras.

Cuando se trate de esterilización de superficies en organos, se aplicará lo más caliente posible.

Precaución. Esta práctica se deberá realizar con cuidado debido a la flammabilidad del alcohol.

12. DE LA FUENTE, E. G.
Director del Instituto Nacional de la Leche.
Comunicación Personal.
13. DIFCO MANUAL OF DEHIDRATED CULTURE MEDIA AND REAGENTS FOR MICRO-BIOLOGICAL AND CLINICAL LABORATORY.
Procedures. 9 th. Edition.
Difco Laboratories Incorporated. Detroit Michigan.
14. FERNANDEZ, C. A.
Instituto Nacional de la Leche.
Comunicación Personal.
15. GELORMINI, N.
Enfermedades Parasitarias en Veterinaria.
Editorial El Ateneo. 1967.
16. GIBBONS, W. J.
Diagnóstico Clínico de las Enfermedades del Ganado.
Auburn University. Auburn Alabama.
Editorial Interamericana S.A. 1967.
17. HALEY, L. D.
Diagnostic Medical Micology.
Appleton Century Crofts New York.
U.S.A. 1964.
18. HERRERA, R. D. (tesis)
Frecuencia de Fasciola hepatica en el Centro Nacional para la -
Educación y Extensión de la Zootécnia de la U.N.A.M.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M.
1971.
19. JANG, S. and BIBERSTAIN, E.
Manual of Veterinary Diagnostic in Microbiology.
Departament of Veterinary Microbiology.
School of Veterinary Medicine of California. Davis. 1976.
20. LAPADGE, G.
Veterinary Parasitology.
Oliver and Boyd. 1956.
21. LEVINE, D. N.
Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man.
Burgess Publishing Company. 1966.
22. MALAGON, V. C. (tesis)
Relación de los Niveles de Inmunoglobulinas con la Presentación
de Enfermedades en la Crianza a Destete Precoz, en Becerras Holg
tein Friesian.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M.
1976.

B I B L I O G R A F I A .

1. BARAJAS, R.J. y LOPEZ, A.J.
Manual de Laboratorio para Bacteriología y Micología.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M.
1974.
2. BLOOD, D. C. and HENDERSON, J. D.
Medicina Veterinaria 3a. Edición.
Editorial Interamericana. 1969.
3. BURDON, K. L. and WILLIAMS, R.
Microbiología. 1a. Edición.
Publicaciones Culturales S.A. 1976.
4. BOURCHET ALFRED.
Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos.
Editorial Acribia. 1972.
5. BURROWS, W.
Text Book of Microbiology 20 th. Edition.
1973.
6. COFFIN, L. D.
Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria. 3a. Edición.
La Prensa Médica Mexicana. 1977.
7. COLES, H. E.
Patología y Diagnóstico Veterinarios. 1a. Edición.
Editorial Interamericana. 1968.
8. CONFEDERACION NACIONAL GANADERA.
Consejo Directivo
Informe
XL Asamblea Ordinaria 45 - 47. 1975.
9. COWAN, S.T. and STEELE, K.J.
Manual for the Identification of Medical Bacteria.
United Press, Cambridge Mass. 1965.
10. CURSO DE ACTUALIZACION.
Enfermedades Parasitarias del Ganado Bovino.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M.
1978.
11. DAVIS, B. D., DULBECCO, R., GINSBERG, H.S. and WOOD, W.R.
Microbiology. 2nd. Edition.
Harper and Hagerstown, Md. 1973.

23. Mc. EWAN, A.D., FISHER, E.W., SELMAN, I.E. and PENHALE, W.J.
Turbidity Test for the Estimation of Immunoglobulin Levels in Neonatal Calf Serum.
Clin. Chem.
Acta 27, 157 - 163. 1970.
24. MEDWAY, W., PRIER, J. and WILKINSON J.
Patología Clínica Veterinaria. la. Edición.
U T H E A . 1973.
25. MEMORIAS DEL CURSO DE ACTUALIZACION SOBRE MASTITIS BOVINA.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia. U.N.A.M.
1978.
26. MEMORIAS DEL CURSO DE TOXICOLOGIA.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia. U.N.A.M.
1978.
27. MERCHANT, I.A. and PACKER, R.A.
Veterinary Bacteriology and Virology.
The Iowa State University Press. 1967.
28. METODOLOGIA SEGUIDA EN EL LABORATORIO DE DIAGNOSTICO DE PATOLOGIA ANIMAL.
Plan Lerma.
Asistencia Técnica.
Tlaquepaque, Jalisco.
29. PATOLOGIA DIAGNOSTICA VETERINARIA No. 1
Asociación de Veterinarios Especializados en Patología Diagnóstica A.C.
Año 1. Vol. 1. No. 1.
México 1975.
30. PRACTICAS DEL CURSO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA.
Departamento de Parasitología.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia. U.N.A.M.
1976.
31. PRUEBA DEL ANTIGENO ACIDIFICADO TAMPONADO PARA EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS.
Dirección General de Sanidad Animal.
32. QUIROZ, R.H.
Parasitología y Enfermedades Parasitarias.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia. U.N.A.M.
1974.
33. RAMIREZ, N.R., LOZA, E.R. y VERAY, C.G.
Manual de Laboratorio de Diagnóstico No. 6
Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Patología Animal.
34. SANCHEZ, C. E.
Prodel - Banrural
Comunicación Personal.

35. SCHALM, W. O.
Veterinary Hematology
Lea and Febiger. Philadelphia 1965.
36. SMITH, H. A. and THOMAS, C. J.
Veterinary Patology 2nd. Edition
Lea and Febiger. Philadelphia 1961.
37. SMYTH, J. D.
Introducción a la Parasitología Animal 1a. Edición.
Editorial CECSA 1965.
38. STEWART, C. P. and STOLMAN, A.
Toxicology. Vol. I and II
Academic Press, New York. 1960, 1961.
39. TARACENA, F. M. y QUIROZ, R. H.
Laboratorio de Parasitología.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia. U.N.A.M.
1974.
40. TORRES, A. C. ING.
Fondo de Garantía y Fomento para la Agricultura, Ganadería y Avicultura.
Comunicación Personal.
41. YUOMANS, G. P., PATERSON, Y. P. and SUMMERS, M. N.
The Biological and Clinical Basis of Infections Diseases.
W.B. Saunders Co. Philadelphia, London, Toronto. 1975.

	Pag.
Cuenta de leucocitos	168
Preparación de frotis sanguíneos	170
Diagrama de técnicas para extensiones de sangre	172
Cuenta diferencial de leucocitos	174
Diagrama para el conteo diferencial de leucocitos	175
Estados evolutivos de los diferentes tipos de leucocitos (lamina)	176
Valores normales en la morfología sanguínea de los - bovinos	177
Determinación de hemoglobina	178
Preparación de soluciones, reactivos y colorantes	180
VII. QUIMICA SANGUINEA	
Consideraciones generales	182
Valores normales de química sanguínea en bovinos	184
Creatinina en suero	186
Calcio. Ferro - Ham modificado	187
Calcio. Diehl	188
Colinesterasa	189
Bilirrubina. (Merckotest) reacción directa	190
Bilirrubina. (Merckotest) bilirrubina total	191
Bilirrubina directa	192
Bilirrubina total y conjugada	193
Fósforo inorgánico. Hycel	194
Determinación de TGPS	195
Determinación de TGOS	196
Urea	197
Deshidrogenasa Sorbitol	198
Cloruros	199
Glucosa. Orto - Toluidina	200
Fósforo inorgánico	201
Proteínas totales. Método Biruet	202
Fosfatasa alcalina. Hycel	203
Gluco - oxidasa	204
VIII. TOXICOLOGIA	
Introducción	205
Diagnóstico de intoxicación	206
Principios generales en la recolección de muestras	206
Especímenes sugeridos para exámenes toxicológicos	207
Cantidades de muestra sugeridas para exámenes toxicológicos	208
Arsénico	209
Plomo	211
Cianuro	212
Nitratos	213
Selenio	214
IX. ESTERILIZACION DE MATERIAL	
Preparación del material a esterilizar	215
Proceso de esterilización	216

I N D I C E .

	Pag.
II. SOLICITUD DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	6
III. BACTERIOLOGIA Y MICOLOGIA	
Técnicas de recolección	13
Medios de transporte al laboratorio	16
Aspectos Básicos en el Diagnóstico Microbiológico	21
Cuadros de identificación de bacterias Gram negativas	28
Cuadros de identificación de bacterias Gram positivas	52
Micología Diagnóstica	73
Medios de cultivo en tubo	76
Medios de cultivo en caja	95
Tinciones	104
Reactivos de pruebas	115
Prueba de sensibilidad a los antibioticos	122
Bacteriología de alimentos	128
Bacteriología del agua	133
IV. PARASITOLOGIA	
Parásitos sanguíneos	136
Parásitos Internas	136
Técnica Macroscópica	140
Técnicas Microscópicas	140
Coccidias en bovinos (lamina)	142
Larvas de Nemátodos. Método de Bermann	143
Cultivo de larvas	143
Parásitos Externas	144
Acaros causantes de sarna en los bovinos (lamina)	147
Vista ventral de las garrapatas más comunes en el ganado vacuno (lamina)	148
Piojos de bovino (lamina)	149
V. SEROLOGIA	
Pruebas de aglutinación para determinación de Bruce - losis	150
Prueba del Antígeno Acidificado Tamponado	150
Prueba de aglutinación Lenta en Tubo	152
Prueba Rápida en Placa (Huddlesson)	155
Prueba de aglutinación para determinación de Leptos - pirosis	157
Determinación de niveles séricos de inmunoglobulinas	160
VI. HEMATOLOGIA	
Recolección de la muestra de sangre	162
Anticoagulantes	162
Microhematocrito	163
Cuanta de eritrocitos	164
Equipo necesario para efectuar recuentos totales de - eritrocitos y leucocitos (lamina)	165
Técnicas de conteo de eritrocitos y leucocitos	166