



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TECNICAS DE COLECCION, CONSERVACION  
Y ENVIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS  
EN CAMPO EN FELINOS SILVESTRES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA  
PRESENTA**

**ROCIO ROJAS GUZMAN**

**ASESORES:**

**DRA. DULCE MARIA BROUSSET HERNANDEZ J.  
MVZ MPA. CARLOS ESQUIVEL LACROIX  
IAZ. MC. ARTURO CASO AGUILAR**



**MEXICO, D. F.**

**2005**

**0249492**



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TÉCNICAS DE COLECCIÓN, CONSERVACIÓN  
Y ENVIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS  
EN CAMPO EN FELINOS SILVESTRES

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**ROCIO ROJAS GUZMÁN**

Asesores:  
Dra. Dulce Ma. Brousset Hernández J  
MVZ MPA. Carlos Esquivel Lacroix  
IAZ. MC. Arturo Caso Aguilar

México D.F.

2005

## Dedicatoria

- ❖ A mis padres a los cuales no tengo palabras suficientes para agradecerles toda su paciencia, comprensión y amor incondicional, tanto en momentos difíciles como en los felices, por apoyarme siempre y en todo. Los amo.
- ❖ A mis hermanos (Leti, Mario y Alfredo) que siempre me apoyan y nunca me dejan caer, siempre serán parte fundamental en mi vida y en mi corazón.
- ❖ A Leonardo Rojas Díaz por su ejemplo de vida, por sus consejos, amor y por cuidarme en todo momento desde donde estás.
- ❖ A mi segunda hermana Miriam Sámano Rojas por ser mi cómplice en todo y estar a mi lado siempre.
- ❖ A mi Ángel de la Guarda Serafina Torres Vieyra por impulsarme a ser una mejor persona, por que siempre estuviste sin condiciones para mí, además por enseñarme a valorar la vida y a las personas que aun están aquí, que la verdadera amistad existe y que ésta perdura por que siempre estarás en mi corazón y nunca te olvidare. GRACIAS Sera.
- ❖ A Diana Herrera Aco por apoyarme y brindarme consejos en los momentos mas indicados, además de ser un ejemplo de fortaleza y superación.
- ❖ A José Magin por cuidarme y apoyarme durante la carrera y por ser mi amigo incondicional.
- ❖ A mis amigos (Mar y Sol, Judith, Adrián, Marina, Claudia e Inkar) por haberme brindado su compañía y momentos bonitos que siempre guardaré en mi memoria.
- ❖ A mis tíos por apoyarme siempre y brindarme consejos.
- ❖ A mi corazón Cristian Ugaz por enseñarme lo que es el amor, gracias por tu apoyo, paciencia, comprensión, por los momentos inmensamente felices que me has dado, por quererme tanto, por cuidarme y por hacerme sentir que soy una persona especial en tu vida. Gracias por abrirme tu corazón. TE AMO.

## Agradecimientos

- ❖ A la Doctora Dulce Brousset por brindarme su apoyo, tiempo y conocimientos para la realización de esta tesis.
- ❖ Al IAZ MC Arturo Caso por darme la oportunidad de trabajar en campo con estos preciosos animales, además de aportar su experiencia en este trabajo.
- ❖ A Carlos Esquivel por apoyarme y darme la oportunidad de realizar esta tesis.
- ❖ A Iván Sánchez Montes de Oca por su valiosa ayuda en este trabajo.
- ❖ A María Antonieta Mojica por toda su ayuda.
- ❖ A Ivonne Acevedo por su amistad y conocimientos sobre Patología Clínica.
- ❖ A Miriam Damián Sandoval por aportar sus conocimientos sin condiciones sobre citología.
- ❖ A Víctor Pacheco por su apoyo, ayuda y amistad.
- ❖ A Rigoberto Hernández Castro por toda su ayuda incondicional.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Rocio Rojas Guzmán  
FECHA: 28/oct/05  
FIRMA: [Firma]

## CONTENIDO

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Objetivo General.....	7
2.2. Objetivos Específicos.....	7
3. Material y Métodos.....	8
3.1. Obtención y organización de la información.....	8
3.2. Verificación y aplicación de la información.....	8
4. Registros.....	9
4.1. Registros Diarios.....	9
4.2. Examen Físico General.....	9
4.3. Anestesia.....	10
4.4. Registro Individual.....	10
4.5. Necropsia.....	11
4.6. Registros Fotográficos.....	12
4.7. Registros Especiales.....	12
5. Muestra de Sangre.....	13
5.1. Sitios de colección de la muestra sanguínea.....	13
5.2. ¿Cuánta sangre tomar?.....	14
5.3. Obtención de la muestra sanguínea.....	14
5.3.1. Tamaño de la aguja .....	14
5.3.2. Técnica de la punción venosa.....	15
5.3.3. Técnica con sistema Vacutainer.....	16
5.3.4. Técnica con sistema Monovette .....	17
5.3.5. Errores potenciales en la extracción de sangre.....	19
5.3.6. Como detener la hemorragia.....	20
5.4. Tipos de análisis posibles a partir de muestras de sangre.....	21
5.4.1. Hemograma.....	21
5.4.1.1. Como se colecta la muestra para Hemograma	

5.4.1.2. Como se conserva la muestra	
5.4.1.3. Tiempo para procesar	
5.4.1.4. Información que proporciona	
5.4.1.5. Técnicas diagnósticas que se deben realizar en campo.....	23
5.4.1.5.1. Frotis Sanguíneo.....	24
a) Técnica del portaobjetos	
b) Técnica de cubreobjetos	
5.4.1.5.2. Hematocrito.....	26
5.4.1.5.3. Medición de sólidos totales.....	27
5.4.1.5.4. Conteo de glóbulos blancos.....	28
5.4.1.5.5. Conteo de glóbulos rojos.....	31
5.4.2. Bioquímica Sanguínea.....	32
5.4.2.1. Como se colecta la sangre para bioquímica Sanguínea	
5.4.2.2. Obtención del plasma y suero	
5.4.2.3. Conservación y tiempo para procesar el plasma y suero	
5.4.2.4. Información que proporciona la bioquímica sanguínea	
5.4.3. Examen bacteriológico.....	35
5.4.3.1. Como se colecta la muestra de sangre	
5.4.3.2. Como se conserva la muestra	
5.4.3.3. Tiempo para procesar la muestra	
5.4.3.4. Información que proporciona	
5.4.4. Examen parasitológico .....	37
5.4.4.1. Como se colecta la muestra de sangre	
5.4.4.2. Como se conserva la muestra	
5.4.4.3. Tiempo para procesar la muestra	
5.4.4.4. Información que proporciona	

5.4.5. Examen virológico .....	38
5.4.5.1. Como se colecta la muestra de sangre	
5.4.5.2. Como se conserva la muestra	
5.4.5.3. Tiempo para procesar	
5.4.5.4. Información que proporciona	
5.4.6. Examen toxicológico .....	39
5.4.6.1. Como se colecta la muestra de sangre	
5.4.6.2. Como se conserva la muestra	
5.4.6.3. Tiempo para procesar	
5.4.6.4. Información que proporciona	
5.4.7. Análisis nutricional.....	41
5.4.7.1. Como se colecta la muestra	
5.4.7.2. Como se conserva	
5.4.7.3. Tiempo para procesar	
5.4.7.4. Información que proporciona	
5.4.8. Examen serológico .....	42
5.4.8.1. Como se colecta la muestra	
5.4.8.2. Como se conserva la muestra	
5.4.8.3. Tiempo para procesar	
5.4.8.4. Información que proporciona	
5.4.9. Análisis hormonal .....	44
5.4.9.1. Como se colecta la muestra	
5.4.9.2. Como se conserva	
5.4.9.3. Tiempo para procesar	
5.4.9.4. Información que proporciona	
5.4.10. Análisis genético .....	44
5.4.10.1. Como se colecta y conserva la muestra	
5.4.10.2. Información que proporciona	
5.4.10.3. Técnica del filtro .....	45
a) Información que proporciona	

	b) Como se colecta	
	c) Como se conserva	
6. Muestra de Heces		47
6.1. Obtención de muestras fecales		47
6.2. Tipos de análisis posibles a partir de muestras de heces		47
6.2.1. Estudio parasitológico		47
6.2.1.1. Heces completas		47
a) Como se colecta la muestra		
b) Conservación de la muestra y tiempo para procesar		
c) Información que proporciona		
6.2.1.2. Parásitos observados macroscópicamente		49
a) Como se colecta y conserva la muestra		
b) Tiempo para procesar la muestra		
6.2.1.3. Frotis fecal		49
a) Como se realiza		
b) Como se conserva		
c) Tiempo para procesar		
d) Información que proporciona		
6.2.2. Cultivo bacteriológico (coprocultivo)		50
6.2.2.1. Como se colecta la muestra		
6.2.2.2. Conservación de la muestra y tiempo para procesar		
6.2.2.3. Información que proporciona		
6.2.3. Estudios de hábitos alimenticios		52
6.2.3.1. Conservación y tiempo para procesar la muestra		
6.2.3.2. Información que proporciona		
6.2.4. Análisis genético		53
6.2.4.1. Conservación de la muestra y tiempo para procesar		
6.2.4.2. Información que proporciona		
6.2.5. Análisis hormonal		54
6.2.5.1. Como se conserva y tiempo para procesar		

6.2.5.2. Información que proporciona	
6.2.6. Análisis químicos y toxicológicos.....	54
6.2.6.1. Como se colecta la muestra	
6.2.6.2. Como se conserva la muestra	
6.2.6.3. Información que proporciona	
6.2.7. Análisis virológico .....	56
6.2.7.1. Conservación de la muestra	
6.2.7.2. Información que proporciona	
7. Muestra de Orina.....	58
7.1. Como se colecta la orina .....	58
7.2. Tipos de Análisis posibles a partir de muestras de orina .....	60
7.2.1. Urianálisis .....	60
a) Como se conserva	
b) Tiempo para procesar	
c) Información que proporciona	
7.2.2. Aislamiento bacteriológico y micológico .....	62
a) Conservación y tiempo para procesar la muestra	
7.2.3. Examen parasitológico .....	63
a) Como se colecta la muestra	
b) Como se conserva	
c) Información que proporciona	
7.2.4. Aislamiento de riquetsias y virus .....	64
a) Como se colecta y conserva la muestra	
b) Tiempo para procesar	
7.2.5. Examen toxicológico .....	65
a) Como se colecta la muestra	
b) Como se conserva	
c) Información que proporciona	
d) Tiempo para procesar	
8. Muestras de mucosas, piel, pelo y ectoparásitos .....	66

8.1 Como se colecta el pelo .....	66
8.1.1. Raspado de piel .....	66
a) Como se colecta	
b) Como se transporta	
c) Tiempo para procesar	
8.1.2. Cepillado de pelo o pelo arrancado .....	67
a) Como se colecta	
b) Como se conserva	
c) Información que proporciona	
8.1.3. Cinta adhesiva .....	68
a) Como se colecta y conserva	
b) Información que proporciona	
8.2. Como se colecta una muestra de piel .....	69
8.2.1. Biopsia de piel .....	69
a) Como se colecta	
b) Como se conserva	
c) Información que proporciona	
8.3. Tipos de análisis posibles a partir de muestras de pelo, piel y mucosas .....	71
8.3.1. Cultivo bacteriológico .....	71
8.3.1.1. Piel .....	71
a) Como se colecta	
b) Como se conserva y tiempo de envío	
8.3.1.2. Mucosas .....	73
a) Como se colecta	
b) Como se conserva	
c) Información que proporciona	
d) Tiempo para procesar	
8.3.2. Muestras micológicas .....	74
8.3.2.1. Como se colectan las muestras .....	74

a) Dermatofitos	
b) Levaduras	
8.3.2.2. Tiempo para procesar las muestras	
8.3.2.3. Información que proporciona	
8.3.3. Toxicología .....	76
8.3.3.1. Como se colecta y conserva el pelo y la piel	
8.3.3.2. Tiempo para procesar las muestras	
8.3.3.3. Información que proporciona	
8.3.4. Análisis Hormonal .....	77
8.3.4.1. Como se colecta y conserva el pelo	
8.3.4.2. Tiempo para procesar	
8.3.4.3. Información que proporciona	
8.3.5. Análisis Genético .....	78
8.3.5.1. Colección, almacenaje y tiempo para procesar la muestra	
a) Muestra de piel	
b) Muestra de pelo	
8.3.5.2. Información que proporciona	
8.3.6. Inmunohistoquímica .....	80
8.3.6.1. Como se colecta y conserva	
8.3.6.2. Tiempo para procesar	
8.3.6.3. Información que proporciona	
8.3.7. Histología o histopatología.....	80
8.3.7.1. Como se colecta y conserva	
8.3.7.2. Tiempo para procesar	
8.3.8. Microscopía electrónica .....	81
8.3.8.1. Como se colecta y conserva	
8.3.8.2. Información que proporciona	
8.3.8.3. Tiempo para procesar	
8.3.9. Ectoparásitos .....	82

8.3.9.1. Como se colectan	
8.3.9.1.1. Artrópodos	
8.3.9.1.2. Miasis o Gusaneras	
a) Miasis subcutánea	
b) Miasis cavitaria	
8.3.9.1.3. Arácnidos	
a) Garrapatas	
b) Ácaros productores de sarna	
8.3.9.2. Como se conservan y envían	
8.3.9.3. Información que proporciona	
8.3.10. Exámen citológico .....	84
8.3.10.1 De lesiones cutáneas y subutáneas .....	84
a) Como se toma y conserva la muestra	
b) Información que proporciona	
c) Tiempo para examinar	
8.3.10.2. De la mucosa rectal .....	85
a) Como se obtiene y conserva la muestra	
b) Información que proporciona	
c) Tiempo para procesar	
8.3.10.3. De secreciones auditivas .....	87
a) Como se colecta y conserva la muestra	
b) Información que proporciona	
c) Tiempo para examinar	
9. Citología .....	88
9.1. Improntas .....	88
9.1.1. De donde se toma la muestra	
9.1.2. Como se debe tomar la muestra	
9.1.3. Información que proporciona	
9.2. Raspados .....	90
9.2.1. De donde se toma la muestra	

9.2.2. Como se debe tomar la muestra	
9.3. Punción con aguja delgada (PAD)	91
9.3.1. De donde se toma la muestra	91
9.3.2. Como se toma la muestra	91
9.3.2.1. Selección de la jeringa y la aguja	
9.3.2.2. Preparación de la zona	
9.3.2.3. Técnica de aspiración	
9.3.2.4. Técnica sin aspiración	
9.3.3. Preparación de extensiones a partir de aspirados de masas sólidas	95
9.3.3.1. Técnica combinada	95
9.3.3.2. Técnica de aplastamiento	96
9.3.3.3. Técnica de frotis sanguíneo	97
9.3.3.4. Otras técnicas de extensión	98
9.3.4. Preparación de extensiones a partir de fluidos	99
9.3.4.1. Técnica de frotis en línea	100
9.4. Fijación de las muestras	101
9.5. Envío de preparaciones de muestras citológicas para su Interpretación	101
10. Aparato Reproductor	104
10.1. Citología vaginal	104
10.1.1. Como se colecta y conserva la muestra	
10.1.2. Información que proporciona la citología vaginal	
10.2. Semen	105
10.2.1. Como se colecta	105
10.2.1.1. Electroeyaculación	
10.2.2. Procesamiento del semen	106
10.2.2.1. Fijación	
10.2.2.2. Procesamientos que se pueden realizar en la estación de campo	

10.2.2.3. Concentración espermática	
10.2.2.4. Longevidad o viabilidad espermática	
10.2.2.5. Determinación del estado del acrosoma	
10.2.2.6. Criopreservación de los espermatozoides	
10.2.2.7. Evaluación y descongelación de los espermatozoides	
10.2.3. Tiempo para procesar la muestra.....	114
10.2.4. Información que proporciona.....	114
11. Necropsia.....	115
11.1. Enfermedades zoonóticas.....	116
11.2. Seguridad personal.....	117
11.3. Manejo de los cadáveres en descomposición.....	117
11.4. Realización de la necropsia.....	118
11.4.1. Evaluación de las características ambientales	
11.4.2. Determinación del estado nutricional del animal	
11.4.3. Descripción de las anomalías halladas en la necropsia	
11.4.4. Procedimiento para la disección de un carnívoro	
11.5. Desinfección del sitio de necropsia.....	127
11.6. Conservación de los tejidos obtenidos de la necropsia de acuerdo a los diferentes tipos de análisis .....	128
11.6.1. Análisis histológico.....	128
a) Como se conserva la muestra	
b) Información que proporciona y tiempo para procesar	
11.6.2. Microbiología (bacteriología y virología).....	129
a) Como se conserva la muestra	
b) Información que proporciona	
c) Tiempo para procesar	
11.6.3. Análisis toxicológico.....	130
a) Como se conserva la muestra y tiempo para procesar	

11.6.4. Análisis citológico.....	130
11.6.5. Análisis genético.....	130
11.6.6. Análisis de inmunohistoquímica.....	131
11.6.7. Microscopía electrónica.....	131
12. Envío de Muestras.....	131
12.1. Preparación de los envases con muestras	
12.2. Información que debe ser incluida en las etiquetas	
13. Cuadro resumen de los diferentes tipos de análisis.....	134
14. Discusión.....	147
15. Conclusión.....	152
16. Referencias.....	155
17. Anexos.....	162
18. Lista de Figuras.	
Figura 1. Sitios de colección de sangre.....	13
Figura 2. Partes del Sistema Vacutainer.....	16
Figura 3. Partes del Sistema S-Monovette.....	19
Figura 4. Técnica para realizar un frotis sanguíneo.....	24
Figura 5. Técnica de frotis sanguíneo con cubreobjetos.....	26
Figura 6. Hematocrito en tubo capilar .....	27
Figura 7. Sistema Unopette .....	29
Figura 8. Técnica de conteo de leucocitos.....	30
Figura 9. Técnica de conteo de eritrocitos.....	31
Figura 10. Conservación de parásitos visibles macroscópicamente.....	49
Figura 11. Técnica de punción con aguja fina.....	93
Figura 12. Preparación citológica combinada .....	96
Figura 13. Extendido citológico por aplastamiento .....	97
Figura 14. Modificación del extendido por aplastamiento.....	98
Figura 15. Extensión con aguja o estrella de mar .....	99
Figura 16. Frotis en línea.....	100
Figura 17. Transporte de portaobjetos.....	103

Figura 18. Cortes a realizar durante la necropsia.....122

Figura 19. Obtención de muestras cerebrales .....125

## 1. RESUMEN

ROJAS GUZMÁN ROCIO. Técnicas de colección, conservación y envío de muestras biológicas en campo en felinos silvestres (bajo la dirección de: MVZ. Dulce Ma. Brousset Hernández J, MVZ. Carlos Esquivel Lacroix e Ing. Arturo Caso Aguilar)

El presente trabajo pretende ser una guía para los investigadores de campo que trabajen con felinos silvestres, para que aprovechen de la manera más óptima las muestras que pueden colectarse de los animales capturados o encontrados muertos. Además de proporcionar los formatos de registros, ya probados en la práctica, que permitirán recabar la mayor cantidad de información de cada salida a campo, lo que servirá para evaluar el estado de salud de los animales, tener un registro de lo observado, y conocer las características del lugar donde se trabajó. Esto es con el objetivo de integrar el trabajo de los veterinarios y los biólogos de campo con los conocimientos de patología clínica y análisis de laboratorios. La información aquí descrita permitirá conocer la manera correcta de colectar y conservar las diferentes muestras de acuerdo al propósito que se busque en la investigación, también la información que proporciona cada tipo de análisis y el tiempo máximo que puede transcurrir entre la colección correcta y el diagnóstico de laboratorio; o las diferentes alternativas para la conservación de las muestras hasta el momento de realizar el análisis en el laboratorio. También se describen las técnicas de algunos análisis de laboratorio que son factibles de realizarse en campo. Además en muchos casos, los investigadores encuentran cadáveres de animales, los cuales pueden aportar información importante, incluyendo la posible causa de la muerte, por lo que se describe la técnica correcta de realizar una necropsia y la colección de las muestras necesarias para los análisis de laboratorio.

## 2. INTRODUCCIÓN

América Latina contiene más de 1,100 especies de mamíferos, lo que constituye más del 25% del total mundial <sup>1</sup> y a México se le reconoce como el territorio del continente americano con el mayor número de especies silvestres de mamíferos nativos <sup>2</sup> y se encuentra en segundo lugar a nivel mundial <sup>3</sup>. México cuenta con 450 especies de mamíferos silvestres nativos, las cuales quedan comprendidas en 157 géneros, 35 familias y 10 órdenes. Nueve géneros son endémicos, lo mismo que 140 especies <sup>4</sup>.

México cuenta con seis especies de felinos diferentes, que son:

- Margay o trigrillo (*Leopardus wiedii*), es el más pequeño de los felinos silvestres que habitan México, su tamaño varía entre 75 y 90cm de longitud y pesa de 2 a 4kg. Habita en las dos vertientes costeras desde Sinaloa y Tamaulipas hacia el Sur <sup>5</sup>. Se encuentra en el apéndice I de CITES, clasificado como en peligro de extinción según la U.S. Fish and Wildlife Service (USFWS) <sup>6</sup> y en peligro de extinción en México según la NOM-059-ECOL-2001 Protección ambiental – especies nativas de México de flora y fauna silvestres – categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo en México <sup>7</sup>.
- Ocelote (*Leopardus pardalis*), su longitud oscila de 0.8 a 1.2m y pesa entre 5 y 13 kilos. Se distribuye en las dos vertientes costeras desde Sonora y Tamaulipas hacia el sur <sup>5</sup>. Está en el apéndice I de CITES, en peligro de extinción según la U.S. Fish and Wildlife Service <sup>6</sup> y en peligro de extinción según la NOM-059-ECOL-2001<sup>7</sup>.
- Jaguarundi (*Herpailurus yaguarundi*), también llamado onza o leoncillo es un felino de entre 90 y 120 cm de longitud total y un peso de 3.4 a 8 Kg. Vive en zonas tropicales, matorrales y pocas veces en lugares fríos. Vive de Sinaloa y Tamaulipas hacia el sur <sup>5,8</sup>. Aparece en el apéndice I de CITES <sup>6</sup> y como especie amenazada según la NOM-059-ECOL-2001 <sup>7</sup>.

- Gato Montés (*Lynx rufus*), tiene una longitud total de 1 a 1.2m y pesa de 5 a 12Kg, vive principalmente en áreas templadas aunque se observa en las costas, también se acerca a las áreas tropicales. Se distribuye en México desde Oaxaca hacia el norte incluyendo Baja California sur <sup>5</sup>. Según la USFWS, la subespecie *Lynx rufus escuinapae* (gato montes mexicano) que habita en la región central de México, se encuentra en peligro de extinción. En listado CITES <sup>6</sup> y la NOM-059-ECOL-2001 <sup>7</sup> no se encuentra clasificado.

- Puma (*Puma concolor*), es el segundo más grande de los félidos mexicanos. Llega a medir de 1.5 a 2.5m de cuerpo y cola, su peso varía de 45 a 100kg. Habita principalmente en las montañas. Potencialmente el puma se distribuye en todo México, principalmente en áreas montañosas, pero por la destrucción del hábitat y la persecución de que ha sido objeto sus poblaciones se han reducido. Sin embargo todavía se le encuentra en la mayor parte de México sur <sup>5</sup>. Ni el CITES ni la NOM-059-ECOL-2001 la tienen clasificada, en la USFWS se considera a la especie como amenazada <sup>6,7</sup>.

- Jaguar (*Panthera onca*) Es el felino más grande de México. Mide de 2 a 2.5m de cuerpo y cola y llega a pesar hasta 120 kg. La distribución teórica de este felino es en ambas costas hasta las laderas de la Sierra Madre, extendiéndose por el norte hasta Sonora y Tamaulipas sur <sup>5</sup>. Se encuentra en el apéndice I de CITES, en peligro de extinción para la USFWS <sup>6</sup> y para la NOM-059-ECOL-2001 <sup>7</sup>.

Las enfermedades han sido consideradas frecuentemente como reguladores de las poblaciones silvestres por tener el potencial de afectar su tamaño, densidad, distribución y estructura, a pesar de las dificultades para demostrarlo de manera concluyente <sup>9</sup>, debido a que comúnmente sus efectos son sutiles y las consecuencias evidentes a largo plazo. Su estudio resulta fundamental para la conservación y el manejo de las especies <sup>10</sup>.

Muchas enfermedades que impactan en la conservación animal son de origen infeccioso, aunque las enfermedades genéticas y tóxicas influyen en la viabilidad de las poblaciones. Las enfermedades infecciosas han causado

pérdidas significativas a través de todos los taxos, pero muchas epidemias catastróficas notables han ocurrido en las poblaciones de carnívoros silvestres en peligro de extinción, como en el caso de la epidemia del virus del distemper canino en el ecosistema del Serengeti, resultando en la pérdida de aproximadamente un tercio de los principales grandes depredadores, entre los cuales se encontraban los leones (*panthera leo*). Este punto es importante sobre todo en el caso de los felinos, ya que son los que se encuentran en la cima de la cadena alimenticia, por ello son los que pueden recibir altas dosis de agentes infecciosos a través de sus presas, por ejemplo los leones adquieren *Mycobacteria* del búfalo (*Bubalus bubalis*) en Sudáfrica, o los guepardos (*Acinonyx jubatus*) adquieren ántrax de la carne infectada <sup>11</sup>.

El estudio del riesgo de las enfermedades en la conservación de las especies requiere del conocimiento de estas frente a los patógenos importantes, así como un entendimiento de la patogénesis de la enfermedad y los factores predisponentes. Las poblaciones no pueden estar libres de enfermedades, pero si minimizar las que causan pérdidas catastróficas o impiden la reproducción <sup>11</sup>.

Actualmente los países que practican la vigilancia sanitaria de sus poblaciones de animales silvestres tienen más probabilidades de detectar la presencia de enfermedades infecciosas o zoonóticas y adoptar medidas de lucha con rapidez. La vigilancia y el seguimiento de brotes patógenos en poblaciones de animales silvestres revisten especial trascendencia en estos tiempos de rápido movimiento de personas y animales, así como del estrecho contacto entre fauna silvestre y doméstica. Uno de los grandes beneficios derivados de un programa eficaz de seguimiento epidemiológico de la fauna silvestre estriba en la detección oportuna de enfermedades nuevas y "emergentes", algunas de las cuales pueden tener graves consecuencias zoonóticas y económicas <sup>12</sup>.

La dificultad técnica de extraer muestras de los animales silvestres en libertad impone la aplicación de técnicas y planteamientos novedosos e imaginativos a las labores de vigilancia y seguimiento de enfermedades

infecciosas de esos animales. Convendría incrementar en lo posible todo tipo de trabajo directo con la fauna silvestre, a fin de obtener información de primera mano sobre la situación y las tendencias de cada enfermedad. Los animales atropellados en la carretera o muertos por cazadores constituyen una excelente fuente de información para las actividades de diagnóstico y vigilancia. Cuando se trabaja con animales silvestres no cabe ahorrar esfuerzos para obtener, siempre que sea posible y práctico, muestras sanguíneas y tisulares con fines de vigilancia y seguimientos sanitarios <sup>13</sup>.

El diagnóstico de campo es un factor muy importante para detectar a tiempo y manejar de forma eficaz las enfermedades infecciosas de la fauna silvestre. Aunque a veces el diagnóstico clínico también resulta útil, la piedra angular del trabajo de diagnóstico en la fauna silvestre es el estudio patológico (necropsias con pruebas de laboratorio complementarias) <sup>14</sup>.

Pese a algunas diferencias significativas de tipo técnico, los métodos y principios del muestreo, entre los que cabe destacar la estandarización de las muestras, el uso correcto del material y la homogeneidad de los métodos de conservación y transporte de las muestras obtenidas de la necropsia macroscópica no varía de una especie a otra. Sin embargo, según las circunstancias y el diagnóstico que se anticipe, diferirán en el tipo de muestra extraída y las pruebas de laboratorio que se le apliquen <sup>14</sup>.

Los trabajos que se realizan con captura de animales silvestres tienen algunos vacíos en lo que se refiere a las técnicas de colección de muestras biológicas debido a que no existen manuales adecuados que proporcionen información suficiente para llevar a cabo las mismas, lo cual en consecuencia favorece la pérdida de información valiosa que es difícil de conseguir. Además, no se aprovechan al máximo dichas capturas para explorar la mayor cantidad de procesos fisiológicos y obtener mayor provecho de los análisis realizados. Por lo tanto, es evidente que la recolección de muestras se debe efectuar de la manera

más eficiente ya que los datos obtenidos del análisis de las mismas permiten conocer el estado de salud de los animales y de este modo llevar a cabo la vigilancia epidemiológica para el control de posibles brotes de enfermedades, con lo cual será factible realizar reintroducciones o traslocaciones de forma exitosa <sup>15</sup>.

Asimismo, haciendo una buena colección de las muestras éstas servirán para estudios genéticos para conocer la variabilidad de las especies, las situaciones de estancamiento genético, evolución y distribución de las poblaciones y estudios reproductivos que aporten conocimiento sobre la biología de la especie y ayude a su conservación <sup>15</sup>.

Además, dentro de los programas de manejo de fauna silvestre, el seguimiento de los animales reintroducidos o reubicados es fundamental para realizar una retroalimentación de la información en la cual se evalúen las técnicas empleadas y los resultados de las investigaciones, por ejemplo, las causas de mortalidad. Esto mediante la recuperación de los animales muertos, enfermos o con problemas de adaptación; para lo cual la necropsia y la toma de muestras biológicas cumplen un papel fundamental para recabar la información <sup>15</sup>.

Por todo lo anterior se decidió realizar una recopilación de la información disponible con la finalidad de elaborar un manual que describa apropiadamente la obtención, preservación, envío y análisis de diferentes muestras biológicas colectadas en felinos silvestres en vida libre debido a que algunos de ellos son especies clasificadas en peligro de extinción en México (NOM-059-ECOL-2001) <sup>7</sup>.

Este manual es una guía que propone diferentes formas de obtención de muestras biológicas y su conservación, incluyendo el tiempo máximo que la muestra puede ser viable para su posterior análisis de laboratorio.

También incluye las pruebas que se deben o pueden realizar en el campo, ya sea por las características de las muestras que hacen indispensable su análisis

inmediato o por las condiciones que se tengan en el campo, como acceso a energía eléctrica, refrigeración, etc, que puedan permitir el uso de algún equipo portátil específico para el análisis de las muestras.

## **2.1 Objetivo General**

Proponer protocolos para evaluar de manera objetiva y sistemática el estado de salud de los felinos silvestres, a través de la obtención y análisis de diversas muestras en los proyectos de campo.

## **2.2 Objetivos Especificos**

- 1.- Describir el método que se debe seguir para realizar un examen físico completo de los felinos silvestres en vida libre.
  
- 2.- Describir las posibles muestras y pruebas diagnósticas que pueden tomarse con la finalidad de obtener la mayor información posible para evaluar el estado de salud de los felinos silvestres.
  
- 3.- Describir las técnicas para la toma y conservación de muestras biológicas de tejidos, fluidos y de células durante las capturas de felinos silvestres en vida libre.
  
- 4.- Describir como se debe realizar una necropsia y las posibles muestras que se puedan obtener de esta, a partir de felinos silvestres en vida libre.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Obtención y organización de la información**

A partir de las técnicas descritas en la literatura para la toma de muestras biológicas de animales domésticos, de laboratorio y de zoológicos, se recopilaron para elaborar un manual que pueda ser utilizado como una guía para facilitar la correcta obtención y análisis de estas muestras en felinos silvestres.

Para lo cual se revisó información publicada en revistas científicas y libros que se encuentran en la biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, de páginas electrónicas, y de bancos de datos relacionados con el tema. La información obtenida se organizó de acuerdo al tipo de muestra obtenida y a los análisis que se pueden realizar a partir de estas. Además, se incluyeron apéndices de tablas y formatos que pueden ser utilizadas en campo.

#### **3.2. Verificación y aplicación de la información**

Con la finalidad de probar que la información mencionada en el párrafo anterior era factible de aplicarse en campo de manera sencilla y confiable, estas técnicas se aplicaron y ajustaron en una salida para trabajo de campo con felinos pequeños en Tamaulipas. Esta área fue seleccionada porque actualmente se lleva a cabo un proyecto de investigación por el M en C. Arturo Caso con felinos silvestres como el ocelote y jaguarundi, con la finalidad de encontrar parámetros ecológicos como el ámbito hogareño, uso de hábitat y patrones de actividad, a través de la captura y radiotelemetría de estos animales silvestres. Dichas capturas se realizan de acuerdo a las técnicas descritas por Caso A, 1998<sup>9</sup>.

## **4. REGISTROS**

Los registros son formatos estandarizados para la recolección de datos, los cuales estarán organizados de tal forma que permitan su análisis.

### **4.1. Registros Diarios**

Los registros diarios son las anotaciones que se registran todos los días al salir a campo a revisar las trampas.

Las condiciones climáticas diarias pueden alterar sustancialmente la interpretación de los niveles de actividad de los felinos, su comportamiento y su fisiología, por lo que los registros diarios deben contener un resumen de las condiciones climáticas <sup>16</sup>. Además, es importante conocer las características geográficas y ambientales del lugar donde se está realizando el trabajo de campo, y también el tipo de fauna, domésticos y silvestres, con la que puede llegar a interactuar el animal. Otro aspecto que debe quedar registrado es la actividad humana que hay en el lugar donde habitan los felinos que se van a estudiar (rancho, granjas, turismo, comercio, investigación etc.); ya que toda esta información será de gran utilidad al momento de la interpretación de los resultados obtenidos. Por lo cual se diseñó un protocolo para recabar dicha información (Anexo 1).

### **4.2. Exámen Físico General**

Todos los felinos inmovilizados u observados deben ser sometidos a una evaluación clínica, ya que cualquier información del estado de salud del felino es valiosa. Las observaciones visuales también son útiles, pero más importantes son los exámenes físicos que se le puedan hacer directamente al animal. Las medidas morfométricas (longitud del cuerpo, cola, del tarso, muesca de la oreja, cintura,

circunferencia de la cabeza, altura a los hombros, circunferencia del cuello, longitud de caninos) también son un componente importante del examen físico <sup>17</sup>.

El diagnóstico exacto de cualquier enfermedad se realiza utilizando la información obtenida mediante 5 criterios, que incluyen: historia, signos clínicos, hallazgos post mortem, análisis químicos y pruebas de laboratorio <sup>18</sup>.

La anamnesis es parte fundamental para la interpretación de los resultados de laboratorio, la cual es fácil de obtener de los animales en cautiverio, pero en las capturas de los animales de vida libre donde no se tiene ese tipo de información detallada, una manera de obtener información útil y organizada es por medio de la elaboración de registros que puedan ser llenados en campo.

La estandarización de los métodos de campo representa una colaboración productiva entre los biólogos de vida silvestre, veterinarios y patólogos <sup>18</sup>.

### **4.3. Anestesia**

Todo el personal de campo debe usar un formulario estandarizado para la recopilación de datos durante los eventos de captura e inmovilización. Esto asegurará que todos los investigadores recopilen los mismos datos en cada inmovilización y que estos datos puedan ser compilados y comparados. Así se podrá determinar cuál es el protocolo más seguro y eficiente para la inmovilización de los felinos silvestres.

### **4.4. Registro individual**

Debido a la importancia de contar con registros en este manual se han propuesto un protocolo para la colección de datos en donde se agrupa la información de anestesia, examen físico y toma de muestras, en un registro individual por animal (anexo 2).

Muchas veces en el momento de tranquilizar y manejar a un felino silvestre los tiempos son muy cortos, por lo tanto se recomienda que durante el manejo solo se marquen en los registros las anomalías observadas durante la inspección clínica. Esto permite ahorrar tiempo y los datos normales podrán ser llenados en el registro una vez terminada la actividad directa con el animal. De la misma manera, parte de la información de anestesia y de toma de muestras biológicas pueden ser llenadas antes y después del manejo del animal, con el objetivo de agilizar el llenado de los registros y optimizar el tiempo para el trabajo de campo mientras el animal permanece anestesiado.

#### **4.5. Necropsia**

A todos los felinos muertos se les debe realizar necropsia, incluyendo los cadáveres parcialmente consumidos. La información es valiosa no solo para el entendimiento de la causa de la muerte, sino también, para establecer una base de datos potencialmente útil para futuros estudios. El examen postmortem deberá ser desarrollado siguiendo los protocolos prescritos para la consistencia y minuciosidad del examen. Algunos programas de conservación tienen establecidos protocolos para especies individuales, que deben ser seguidos correctamente. Como un ejemplo están los protocolos de necropsia del guepardo, que requiere completar una lista de tejidos fijados para enviarlos al patólogo, para un estudio interinstitucional e internacional continuo de las enfermedades <sup>6</sup>.

Como es necesario un protocolo de necropsia para el buen desarrollo de esta, también se diseñó un registro para recabar la mayor cantidad de información de ese procedimiento (anexo 3 y 4). Además en el capítulo 11 de esta tesis se describen de manera detallada los pasos a seguir para la realización sistemática de una necropsia.

## **4.6. Registros Fotográficos**

Los investigadores de campo prefieren una página simple con respuestas que se vayan marcando y protocolos limitados. Los mejores resultados se han obtenido al juntar los protocolos de registros con fotografías. Los registros fotográficos permanentes han proporcionado datos invaluable para el análisis retrospectivo de la progresión y regresión de signos de enfermedades de individuos o poblaciones <sup>16</sup>.

Las cámaras, incluyendo lentes macros son esenciales para un equipo de campo, actualmente la tecnología de las cámaras fotográficas digitales permite el almacenamiento y mejor análisis para el diagnóstico visual de diferentes patologías, así también las video grabaciones permitirán observar las acciones de campo con más detalle después de que hayan sido realizadas <sup>16</sup>.

## **4.7. Registros Especiales**

Existen algunos registros para actividades de campo especiales (como la colección de semen (anexo 5), que requieren otro tipo de información específica para la interpretación de los resultados.

Los siguientes capítulos describen de manera detallada la toma de diferentes muestras biológicas, así como su conservación y la información que pueden proporcionar.

## 5. MUESTRA DE SANGRE

La sangre venosa es la más usada ya que es la de más fácil acceso para obtener un buen volumen de sangre y sirve para todas las pruebas excepto mediciones de pH y gas sanguíneo, los cuales son difíciles de medir en campo. Además, por lo general los registros de valores sanguíneos son de sangre venosa<sup>19</sup>.

Es importante mencionar que la persona que tome la muestra de sangre debe estar familiarizada con la anatomía y los sitios de elección para la obtención de muestras<sup>17,20</sup>.

### 5.1. Sitios de colección de la muestra sanguínea

El sitio va a depender del tamaño del animal y la cantidad de sangre necesaria. Las venas que pueden ser usadas son<sup>21</sup>: (ver figura 1)

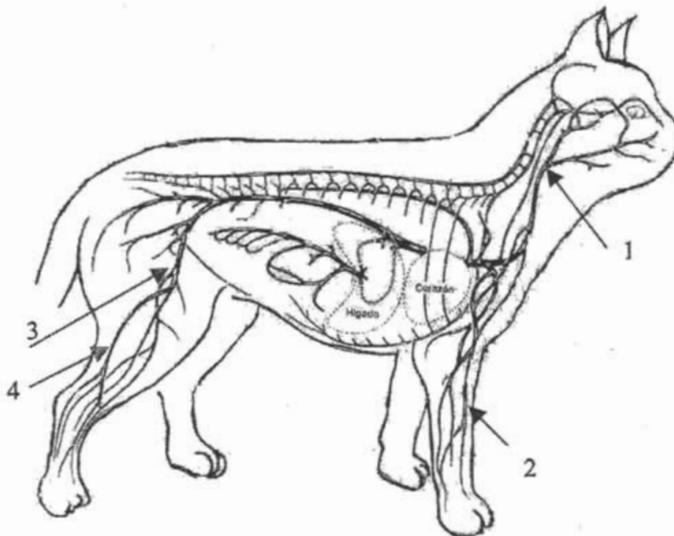


Figura 1. Sitios de colección de sangre. 1) vena yugular (cantidades mayores de sangre) 2) vena cefálica 3) vena femoral 4) vena safena) (Tomado y modificado de Dyce KM, 1991).

## 5.2. ¿Cuánta Sangre Tomar?

La cantidad de sangre depende del tamaño del animal y las pruebas que se vayan a realizar. Para esto se debe verificar con el laboratorio la cantidad que ellos necesitan, ya que esto puede variar de acuerdo al equipo con el que se cuente <sup>22</sup>. La cantidad tomada debe ser el doble de la cantidad mínima que se necesite, lo cual dará un volumen suficiente si se necesita repetir la prueba por errores o mal funcionamiento del equipo <sup>19</sup>.

Por regla general se considera seguro tomar aproximadamente 0.5ml/kg de peso corporal en todas las especies <sup>23,24</sup>. La cantidad de sangre total en felinos es de 7-8% del peso del animal de la cual se puede tomar del 0.7 al 1% sin poner en riesgo su vida <sup>24</sup>.

## 5.3. Obtención de la muestra sanguínea

La sangre debe ser colectada cuando el felino este inmovilizado <sup>17</sup>.

### 5.3.1. Tamaño de la aguja

En general el tamaño de la aguja depende del tamaño del animal y de la vena a canalizar, aunque se recomiendan los calibres gruesos para evitar lesionar a los eritrocitos y causar hemólisis de la muestra. Para la mayoría de los felinos pequeños (menores a 20 kg) agujas de 20 a 22G son apropiados, y generalmente, se utilizan en felinos grandes (mayores a 20 kg) agujas con una calibración de 18-22 y 1-1 ½ pulgadas de largo <sup>17, 19,25</sup>.

### 5.3.2. Técnica de la punción venosa <sup>19,26</sup>.

- 1.-El sitio de punción debe ser limpiado con algodón y alcohol, dejar que se evapore antes de tomar la muestra para evitar su hemólisis.
- 2.- Ocluir la vena por presión digital o mediante un torniquete.
- 3.- Estirar la piel sobre la vena para inmovilizarla.
- 4.- Insertar la aguja con el bisel hacia arriba. Si ha sido necesario interrumpir la circulación por un lapso largo, para poder localizar la vena e insertar la aguja, debe suspenderse la presión digital antes de extraer la muestra de sangre para permitir que se reanude la circulación. Esto evita cualquier posibilidad de hemoconcentración causada por éstasis.
- 5.- Aplicar tracción lenta y suave al émbolo de la jeringa hasta obtener la cantidad deseada de sangre, ya que la succión demasiado enérgica es capaz de colapsar la vena impidiendo el paso de sangre a la jeringa.
- 6.- Retirar la aguja, después de quitarla de la jeringa, vaciar la sangre con mucho cuidado en el tubo tratando que está caiga sobre la pared del tubo para evitar hemólisis
- 7.- En caso de que el tubo que utilizado con anticoagulante, se debe homogenizar la muestra invirtiendo lentamente el tubo repetidas veces <sup>26</sup>.

Es importante que la relación anticoagulante – sangre sea la correcta para evitar alteraciones en la muestra. En los tubos que se venden comercialmente se recomienda llenar las dos terceras partes de este con sangre. El volumen total del tubo varía de 1 a 10 ml.

Los anticoagulantes mas utilizados son:

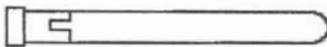
- EDTA: (ácido etilen diamino tetra acético), el cual se recomienda para hematología ya que es el que mejor conserva las células y no interfiere con las tinciones hematológicas.

- Heparina: puede ser usada para hematología tomando en cuenta que con este anticoagulante se afecta un poco la tinción y existe una mayor degeneración celular.
- Citrato de Sodio al 3.8% : Es el ideal para pruebas de coagulación, no se debe ocupar para hematología.

### 5.3.3. Técnica para la punción venosa con vacutainer:

Existe en el mercado el Sistema Vacutainer®<sup>1</sup> (Sistema de tubo al vacío) el cual es útil cuando se necesitan varias muestras de un solo animal. El sistema está compuesto por tres elementos básicos (ver Figura 2)<sup>27</sup> :

- 1.- Un tubo de vidrio con un vacío determinado que permite una extracción controlada de sangre.



- 2.- Un soporte de plástico que se usa para asegurar la aguja durante la venopunción .



- 3.- Aguja estéril desechable para coleccionar sangre.



Figura 2. Partes del Sistema Vacutainer

<sup>1</sup> ® Marca registrada por Beckton Dickinson.

La técnica consiste en <sup>19,27</sup> :

- 1.- Enroscar firmemente la aguja al soporte sin retirar la funda de ésta.
- 2.- Los tubos que contengan anticoagulante deben ser golpeados suavemente para remover el anticoagulante que se localice entre el tapón y la pared del tubo.
- 3.- Insertar el tubo en el soporte hasta la aguja ya colocada, para que el tapón coincida con la línea guía del soporte.
- 4.-Desinfectar el lugar de la punción.
- 5.- Quitar la funda de la aguja y hacer la punción.
- 6.- Empujar el tubo hasta el final del soporte, perforando el diafragma del tapón para que empiece a fluir la sangre al tubo.
- 7.- El tubo es quitado de la aguja y tubos adicionales pueden ser insertados
- 8.- Cuando se termina el vacío del tubo deja de fluir sangre, se retira la aguja de la vena inmediatamente y se presiona el lugar de la punción con un algodón.
- 9.-Retirar el tubo del soporte.
- 10.- Si el tubo es con anticoagulante, debe invertirse suavemente de 8 a 10 veces para obtener una mezcla homogénea del anticoagulante con la sangre.

Se debe tener cuidado de escoger el tamaño adecuado del tubo de acuerdo al tamaño del animal, ya que un tubo muy grande puede provocar que la vena se colapse impidiendo la toma de la muestra.

#### **5.3.4.Técnica con sistemas Monovette**

El sistema de extracción de sangre S-Monovette<sup>® 2</sup> ofrece la posibilidad de escoger la técnica de extracción. Puede extraer sangre con el principio de aspiración o vacío, así como combinar las ventajas de ambas técnicas. En una extracción múltiple, la punción y primera extracción de sangre se puede realizar con la aguja colocada, utilizando la técnica de aspiración. La alta transparencia del

---

<sup>2</sup> ® Marca registrada por Sarted.

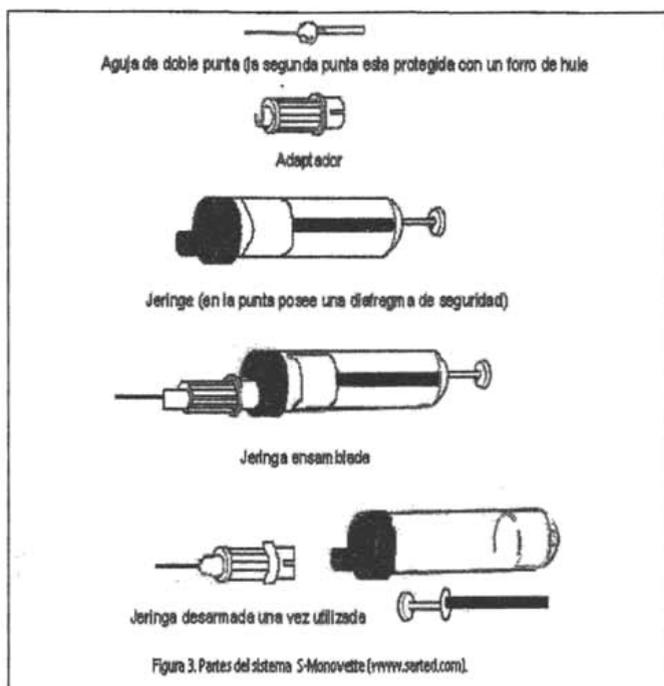
tapón roscado permite confirmar la punción en vena. El resto de las S-Monovette, en tanto que el estado de las venas lo permita, se pueden rellenar con el principio de vacío. Durante el cambio de las S-Monovette, la aguja permanece en la vena, con lo que se puede realizar una extracción múltiple sin goteo. Para extraer sangre de conexiones tipo luer, la S-Monovette® se puede combinar con el Multiadaptador. Para extraer sangre con una aguja con aleta tiene a su disposición la aguja Multifly®, con adaptador incorporado, que se puede conectar directamente a S-Monovette® (Figura 3) <sup>28</sup>.

#### Principio de aspiración <sup>28</sup>.

1. La aguja debe conectarse a la S-Monovette® justo antes de la extracción. La aguja se fija mediante tres puntos de conexión en el cono de S-Monovette. A continuación se punciona la vena.
2. Se tira lentamente el vástago del émbolo hasta la posición final. En extracciones múltiples, se fijan las diferentes S-Monovette en la aguja colocada y se extraen muestras de sangre como se ha descrito anteriormente.
3. Se retira la última S-Monovette® de la aguja. Ahora se puede retirar la aguja de la vena. Para su transporte y centrifugación, se fija el pistón en la base de la S-Monovette® y se rompe el émbolo.

#### Principio de vacío <sup>28</sup>.

1. El vacío de la S-Monovette se crea fijando el pistón en la base. A continuación se debe romper el émbolo.
2. La venopunción se realiza con la aguja de doble punta S-Monovette®.
3. La S-Monovette® con vacío se conecta a la aguja. Al terminar la extracción, se retira el último tubo S-Monovette®. Y por último se extrae la aguja de la vena.



### 5.3.5. Errores potenciales en la extracción

La obtención y manipulación descuidada o incorrecta de la muestra de sangre puede dañar las membranas celulares, causando una hemólisis de los glóbulos rojos y una ruptura y deformación de los glóbulos blancos, que harán a la muestra indescifrable. Algunos de los errores más comunes en la extracción y recolección de la sangre, que se deben evitar son:<sup>24</sup>

1. Aspiración rápida y forzada de la sangre, especialmente si el calibre de la aguja es inadecuado.
2. Introducir la sangre en un segundo recipiente a través de la aguja. Deben extraerse la aguja y el tapón, para verter la sangre cuidadosamente en el recipiente.
3. El agua presente en la jeringa, la aguja o el tubo provocará deterioros celulares debido a la ósmosis.

4. Extraer poca sangre para la cantidad de anticoagulante presente, provocará errores en la dilución o deterioro directo de las células producidos por una alta concentración de anticoagulante.
5. Una extracción demasiado lenta o un retraso en la adición de un anticoagulante, provocará un espesamiento de las plaquetas y la formación de coágulos.
6. Dilución incompleta o incorrecta del anticoagulante. El tubo debería rotarse suave pero uniformemente, de modo manual, por medio de un rotor automático o también puede hacerse rotar sobre una superficie plana.
7. Ejercer sobre el tubo una excesiva fuerza física, como agitarlo, sacudirlo o dejarlo caer.
8. Permitir que la muestra se sobrecaliente o se hiele.
9. Mantener la muestra a temperatura ambiente durante demasiado tiempo, permitiendo la degeneración de las células (autólisis). Si no puede prepararse la muestra en el espacio de una hora desde su obtención, debe refrigerarse para obtener óptimos resultados.

### **5.3.6. Como detener la hemorragia**

En muchos casos la simple presión sobre el sitio de punción en la vena parará la hemorragia. Dejar la presión por lo menos dos minutos antes de revisar. Si la hemorragia no se ha detenido y el animal no presenta signos de estrés severo (lucha constante, sobrecalentamiento, vocalización, respiración rápida) aplicar presión por más tiempo. Si eso no detiene la hemorragia y el animal comienza a estresarse severamente aplicar subsulfato ferrosos, nitrato de plata, o permanganato de potasio (en ese orden de preferencia) en el sitio hasta que se detenga el sangrado. Estos líquidos coagularán la sangre pero también pueden causar daño a los tejidos cercanos, así que no se deben utilizar en forma excesiva<sup>22</sup>.

## **5.4. Tipos de análisis posibles a partir de muestras de sangre**

### **5.4.1. Hemograma**

El Hemograma es una herramienta de diagnóstico útil para describir la cantidad y calidad de los elementos celulares sanguíneos (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), así como sustancias contenidas en el plasma (proteínas de diferentes tipos) <sup>29</sup>.

#### **5.4.1.1. Como se colecta la muestra para Hemograma**

Las muestras para el Hemograma deberán ser colectadas en tubos limpios, secos y con anticoagulante. El anticoagulante de elección será el E.D.T.A. (Sales de Na o K de ácido etilidiamino tetraacético), el cual actúa formando sales insolubles de calcio (Tubos vacutainer con tapa color morado). La cantidad adecuada de EDTA debe ser de 1.5 mg por ml de sangre <sup>29,30</sup>.

Es recomendable que después de vaciar la sangre de la jeringa al tubo de vidrio, se realice inmediatamente un frotis para evitar cambios en la morfología de las células por acción del anticoagulante, con las últimas gotas de sangre que queden en la jeringa. Si esto no es posible, también se puede realizar el frotis con la sangre con EDTA. Lo mejor es hacer cuatro frotis por felino y sólo teñir dos en el campo <sup>17</sup>.

Si solo se obtiene una pequeña cantidad puede recolectarse en tubos capilares, en los cuales se llena solo dos terceras partes.

#### **5.4.1.2. Como se conserva la muestra**

Una vez colectada la muestra esta se debe mantener en el tubo y dejar unos 15 minutos a temperatura ambiente, protegida del sol, y posteriormente

guardarla en refrigeración a 4°C, con el fin de evitar choque térmico y como consecuencia hemólisis de la muestra. La muestra no debe ser congelada, por que se puede producir hemólisis de los glóbulos rojos y ruptura y deformación de los góbulos blancos, interfiriendo en los resultados <sup>24,30,31</sup>.

Si se demorara mas de 48 hrs el envío de la sangre al laboratorio, existen pruebas diagnósticas que deben realizarse en el campo como son el hematocrito, sólidos totales y conteo de leucocitos, para los cuales se necesita sangre completa. Para realizar estos exámenes se requiere una centrífuga, tubos capilares, una tabla de hematocrito, un refractómetro, un microscopio, y un equipo Unopette para el conteo de leucocitos. Las técnicas se detallan más adelante (ver página 31) <sup>17</sup>.

Una vez realizadas dichas pruebas se debe centrifugar el tubo a 3500 rpm durante 10 minutos para separar las diferentes fracciones de la sangre. Como este procesamiento se debe realizar preferiblemente antes de que hayan pasado 4 horas de haber tomado la muestra, se puede tomar una pequeña muestra y ponerla en tubos de microhematocrito (tubos capilares), antes de centrifugarla para realizar las pruebas mencionadas en el párrafo anterior. El plasma obtenido debe de trasvasarse a tubos congelables para su almacenamiento a largo plazo <sup>17</sup>.

El plasma debe transportarse en nitrógeno líquido o en hielo seco para garantizar que siempre esté congelado <sup>17</sup>.

El frotis se debe conservar a temperatura ambiente y en una caja de portaláminas, como se describirá en el apartado de frotis sanguíneo <sup>22,32</sup>.

#### **5.4.1.3. Tiempo para procesar**

Se recomienda procesar las muestras de sangre entera en las siguientes 24 hrs. pero cuando esto no es posible se puede retardar hasta 48 hrs <sup>22,31</sup>.

En el caso de que no se pueda mandar la sangre con EDTA al laboratorio para realizar el hemograma completo, es importante realizar un frotis sanguíneo que es una muestra que se puede conservar viable para analizar por un largo periodo de tiempo y las pruebas en campo que se describen en este capítulo y que son parte importante del Hemograma de tal forma que el plasma pueda ser transportado en congelación para almacenarse por un mayor periodo de tiempo hasta llegar al laboratorio sin ningún problema <sup>17</sup>.

#### **5.4.1.4. Información que proporciona**

El Hemograma sirve para evaluar el estado general de salud del animal, ya que da un panorama general de los componentes sanguíneos incluyendo la cantidad aproximada, tamaño y forma de las células sanguíneas (eritrocitos, plaquetas, leucocitos), así como de las proteínas totales. Esto permite evaluar algunos trastornos como anemias, inflamación, deshidratación, procesos alérgicos ó algunas parasitosis entre otros <sup>33</sup>.

#### **5.4.1.5. Técnicas diagnósticas que se deben realizar en campo.**

- **Frotis sanguíneo:** Proporciona el recuento diferencial de cada uno de los tipos de leucocitos (eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monocitos y plaquetas), presentes en la sangre <sup>34</sup>.
- **Hematocrito:** El hematocrito nos da la relación entre el volumen ocupado por los eritrocitos y el de la sangre total y depende principalmente de la concentración de células rojas <sup>35</sup>. Esta prueba nos puede ayudar a detectar un aumento o una disminución en la cantidad de eritrocitos (Ej. Anemias, deshidratación).
- **Medición de sólidos totales:** La determinación de las proteínas plasmáticas es importante para detectar la presencia de procesos patológicos

como inflamación y alteraciones fisiológicas como deshidratación y desnutrición, pero no indica enfermedad específica <sup>31</sup>.

- **Conteo de glóbulos blancos:** Permite obtener el valor absoluto de leucocitos presentes en el animal <sup>24</sup>.
- **Conteo de glóbulos rojos:** Nos da el valor absoluto de eritrocitos presentes en el animal <sup>24</sup>.

#### 5.4.1.5.1. Frotis sanguíneo

**Como realizar un frotis sanguíneo.** (Figura. 4).

##### a) Técnica del portaobjetos:

- 1.- Se coloca una muestra muy pequeña de sangre entera con EDTA o sin anticoagulante, cerca del extremo del portaobjetos y se apoya un segundo portaobjetos sobre la superficie del primero de manera que formen un ángulo de 45°.
- 2.- Se desliza el segundo portaobjetos hacia atrás hasta tocar la gota de sangre para que esta corra por capilaridad a lo largo del extremo.
- 3.- Se empuja hacia delante el segundo portaobjetos con un movimiento uniforme y continuo para formar una película delgada de células.

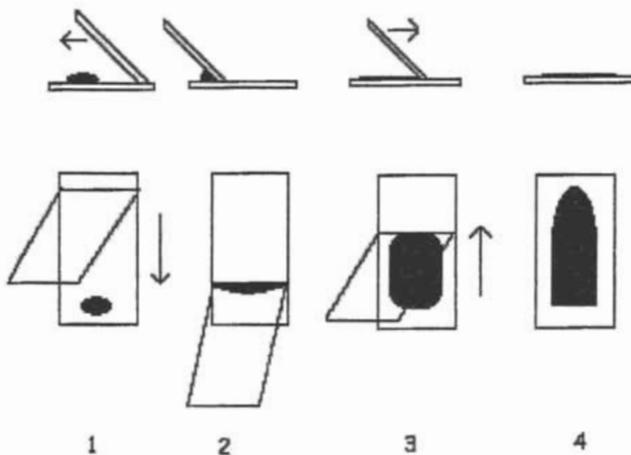


Figura 4. Técnica para realizar un frotis sanguíneo (Tomado y modificado de Deem SI, 2001)

4.- Dicho frotis debe quedar en forma de pluma para que pueda ser evaluado correctamente, ya que este se va a dividir en tres partes siendo la parte del cuerpo la que será analizada<sup>30</sup>.

5.- Secar al aire rápidamente.

6.- Proteger la muestra de polvo, moscas o cualquier sustancia que pueda llegar a alterar la morfología celular.

7.- Los frotis se deben identificar con un lápiz punta de diamante en un extremo externo al frote o bien con un lápiz de grafito en el extremo grueso del frotis (en la cabeza del frotis), para evitar que se pierda la identificación al momento de teñirlo<sup>30</sup>.

8.- Se recomienda teñir algunos frotis con una tinción hematológica como Dift-Quick, la cual es una buena opción para el campo, ya que es muy rápida y fácil de realizar en dichas condiciones, tinción de Wright o solamente fijarlos con alcohol etílico al 70% o alcohol metílico, para preservar mejor la muestra, y dejar otros sin teñir por si se requieren realizar tinciones especiales<sup>17, 36</sup>.

### **b) Técnica del cubreobjetos:** (Figura. 5)<sup>24</sup>.

Esta es otra opción para realizar un frotis.

1.- Colocar una gota muy pequeña de sangre en el centro de un cubreobjetos.

2.- Colocar con suavidad un segundo cubreobjetos en forma diagonal sobre el primero y la sangre se extenderá por capilaridad entre los dos cubreobjetos.

3.- Cuando la sangre se ha extendido, se desliza rápidamente un cubreobjetos sobre el otro hasta separarlos.

4.- Se secan los dos frotis al aire y se protegen del polvo, moscas o cualquier sustancia que altere la morfología celular.

5.- Se debe teñir de la manera ya descrita

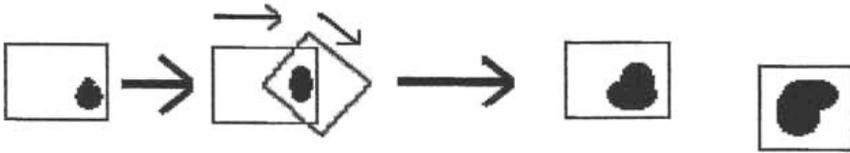


Figura 5. Técnica de frotis sanguíneo con cubreobjetos (tomado y modificado de Yoigt OL, 2003)

Las causas más frecuentes por las que sale mal un frotis son <sup>32</sup>:

- Colocar una gota muy grande de sangre para realizar el frotis.
- Emplear porta o cubreobjetos grasosos o sucios.
- No formar el ángulo adecuado entre los 2 portaobjetos.
- Usar portaobjetos con bordes irregulares.
- Deslizar lentamente o sin decisión el cubre o portaobjetos sobre la gota de sangre.
- Soplar sobre el frotis.
- Dejar la muestra en contacto con polvo o moscas.
- Dejar el frotis sin fijar cuando la muestra va a tardar en tefirse.

#### 5.4.1.5.2. Hematocrito

La sangre para la medición del hematocrito puede ser colectada sin anticoagulante si se va a procesar inmediatamente, y si no, será necesario colocar la sangre en un tubo con anticoagulante con EDTA de donde se traspasa una pequeña cantidad a un tubo capilar <sup>17,31</sup>.

Dicha técnica se realiza llenando con sangre las dos terceras partes de dos tubos capilares, posteriormente se cierra el extremo opuesto de los tubos capilares con fuego o sellan con plastilina diseñada para tal fin. Ya sellados se colocan en una microcentrifuga de modo que la parte sellada quede hacia abajo o afuera, se

centrifugan los capilares a 10 000 o 13 000 rpm durante 3 minutos, o bien en una centrífuga (observe que el área sellada con plastilina esté en el diámetro exterior de la centrífuga) a 3000 - 3500 revoluciones por minuto (rpm) por diez minutos. Como los eritrocitos tienen una gravedad específica más alta (es decir, son más pesados) se concentran en el fondo del tubo y aparecen como una banda ancha roja oscuro. El hematocrito se lee con una tabla de hematocrito (Anexo 6). Se coloca el capilar sobre la tabla, haciendo que coincida el principio de la banda de glóbulos rojos con la línea 0 de la tabla, la parte superior del plasma debe coincidir con la línea del 100%. Se lee el porcentaje donde termina la banda de glóbulos rojos <sup>17,31</sup>.

Se puede observar en el capilar una banda blanco-grisácea por encima de la banda rojo oscura, ésta corresponde a los glóbulos blancos o leucocitos y las plaquetas, y es muy pequeña. El plasma es la banda amarillenta que se encuentra por encima de la banda de leucocitos (Figura. 6). El plasma obtenido por este método puede ser usado para determinar la concentración de sólidos totales a través de un refractómetro. El color y la transparencia del plasma deben anotarse ya que tienen importancia diagnóstica <sup>17</sup>.

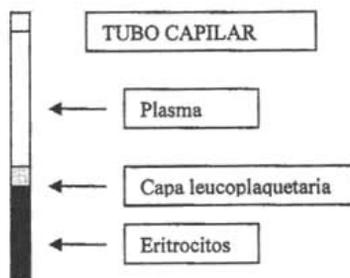


Figura.6 Hematocrito en tubo capilar.

#### 5.4.1.5.3. Medición de sólidos totales

El refractómetro se usa comúnmente para medir las proteínas totales en sangre y la densidad específica de la orina <sup>17</sup>.

La concentración de proteínas totales en sangre se puede medir aprovechando el plasma que se obtiene de la centrifugación de la sangre en el tubo de microhematocrito. Este tubo de vidrio se debe partir por encima de la banda de leucocitos, después de haber leído el hematocrito. El plasma que está en tubo capilar debe de ser puesto sobre el prisma del refractómetro, con mucho cuidado de no rayar el prisma, ya que esto desvirtúa las lecturas <sup>17</sup>.

Indicaciones <sup>17</sup>:

- Examinar el prisma y el cubre-prisma: si se observa alguna suciedad limpiarlo con agua destilada estéril y secar con un papel que no raye la superficie del prisma.
- Poner una gota de fluido sobre el prisma y cubrirla con el cubreprisma.
- Dirigir el refractómetro hacia una fuente de luz brillante, preferiblemente luz solar.
- Enfocar la línea limítrofe, dándole vuelta al ocular.
- Leer y registrar el resultado obtenido

#### **5.4.1.5.4. Conteo de glóbulos blancos (leucocitos)**

Para contar glóbulos blancos en condiciones de campo, se recomienda el uso del método manual Unopette (Becton – Dickinson®, Rutherford, NJ). Este equipo contiene un envase con una solución diluyente de oxalato de amonio o ácido acético o una mezcla de ambos, la cual hemolisa los glóbulos rojos y una mini-pipeta capilar que permite hacer una dilución de 1:100 de la sangre. También la dilución se puede hacer con una pipeta para conteo de glóbulos blancos Thoma. Las células se cuentan usando una cámara de conteo celular o hemocitómetro y con un microscopio. Esto requiere del acceso a energía eléctrica, o su adaptación para trabajar sin ella <sup>17,24</sup>.

-Dilución Unopette (dilución 1:100):

Este sistema consiste en una cantidad de diluyente previamente medida, en un recipiente de plástico sellado, un tubo capilar calibrado con un mango en un extremo y una tapa puntiaguda (Figura. 7)

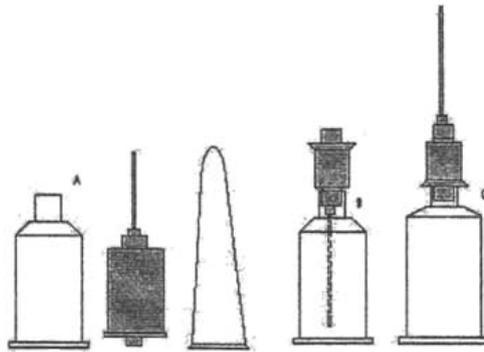


Figura 7. Componentes del Sistema Uropette (A). Rellenando el recipiente (B). Montaje del cuentagotas (C). (Tomado y modificado de Voigt GL\_2003).

Una cantidad de sangre medida con el tubo capilar es agregada al envase con la solución hemolítica, una vez que se ha agregado la sangre, ésta debe ser mezclada con la solución cuidadosamente. Después de diez minutos se vuelve a invertir el envase para homogeneizar la mezcla. El envase puede usarse como gotero una vez transcurrido el tiempo adecuado. El iris del microscopio debe cerrarse al punto de que se vea el mayor número de células posible. Para llenar el hemocitómetro se debe poner el cubreobjetos sobre la cámara, y la cámara se debe llenar a través de la capilaridad. Antes de contar las células en la cámara, ésta debe dejarse reposar por unos minutos para garantizar que las células se adhieran al cubreobjetos. Luego se pone bajo el microscopio y con el objetivo de 4X se busca la cuadrícula de conteo. Usando el objetivo de 10X se cuentan las células en los 9 cuadros primarios (Figura. 8 (B)). El número de células contadas se multiplica por el factor de dilución (número total de células contadas + 10% de las células contadas por factor de dilución de 100). Los valores vienen expresados en células por microlitro ( $\mu\text{l}$ ) de sangre <sup>24</sup>.

Por ejemplo: si se contaron 80 células,  $80 + 8 = 88 \times 100 = 8800$  células/ $\mu\text{l}$  <sup>17</sup>.

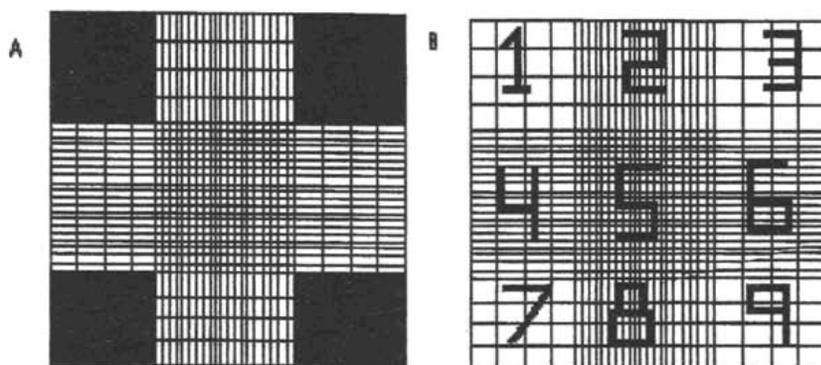


Figura 8. Cuadros de la cámara de Neubauer donde se cuentan los leucocitos (Tomado y modificado de Voigt GL, 2003).

#### - Sistema de dilución manual con pipeta

Existe también otro método en el cual se utiliza la pipeta Thoma o una Unopette con una dilución 1:20. En este método la sangre entera acabada de extraer ó con EDTA es aspirada con la pipeta hasta la marca 0.5, limpiar cualquier resto de sangre que quede en el exterior de la pipeta, añadir el diluyente ácido (Turk) hasta la marca 11, mezclar durante 2-3 minutos en una máquina de mezclas o manualmente moviendo la pipeta transversalmente y utilizando la pipeta como gotero se llena la cámara de Neubauer para el recuento, el cual se efectuará en los cuatro cuadrados grandes de las esquinas del hemocitómetro (Figura. 8 (A)). Con esta técnica el recuento se efectúa en  $4 \text{ mm}^2$  ( $\times 1/4^a$ ), el espacio entre el cubreobjetos y la cámara es de  $0.1 \text{ mm}$  ( $\times 10^b$ ), y la proporción de la dilución es de 1:20 ( $\times 20^c$ ). Si el recuento fue de 146, los cálculos son <sup>24</sup>:

Nº núcleos x Nº de cuadrados x profundidad de la cámara x dilución

$$146 \times (1/4^a \times 10^b \times 20^c) =$$

$$146 \times ((10 \times 20)/4) =$$

$$146 \times 50 = 7300 \text{ GB/mm}^3.$$

#### 5.4.1.5.5. Conteo de glóbulos rojos (eritrocitos)

El tallo de las pipetas de glóbulos rojos presenta marcas de 0.5, 1 y 101 que representan las porciones de dilución, no volúmenes específicos. La dilución debe realizarse con una sustancia isotónica para evitar la ruptura o distorsión de las células. Habitualmente se utiliza una solución salina estéril (0.85 por ciento de NaCl en agua destilada), pero también se utilizan fluidos basados en otras sales, como la solución de Gower, la de Hayem o la de Dacie. La técnica de dilución (llenado de la pipeta), es la misma que la utilizada para el conteo de leucocitos, con la diferencia que la dilución final es de 1: 200 <sup>24</sup>.

El recuento de eritrocitos se realiza en el cuadro central de los nueve cuadros grandes, en el centro del campo. El conteo de los glóbulos rojos se efectúa en 5 de los de los 25 cuadros pequeños del centro (las cuatro esquinas y el centro), con el objetivo de 40x. (Figura. 9). El cálculo se realiza en 1mm<sup>2</sup>, que es el área central, y como solo se cuentan 5 de los 25 cuadros centrales se debe corregir ese número (x 5<sup>a</sup>), el espacio entre la cubierta de la cámara es de 0.1 mm<sup>2</sup> (x 10<sup>b</sup>), y la proporción de la dilución de 1:200 (x 200<sup>c</sup>). Por ejemplo si el recuento fue de 760 células, los cálculos serían <sup>24</sup>:

Nº de células x Nº de cuadrados x profundidad de la cámara x dilución

$$760 \times (5^a \times 10^b \times 200)$$

$$760 \times (10\ 000) = 7.600.000 \text{ GR/mm}^3$$

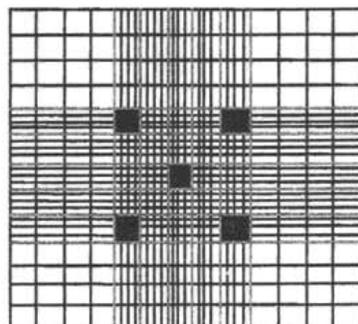


Figura 9. Cuadros de la cámara de Neubauer donde se cuentan los eritrocitos (tomado y modificado de Voigt GL, 2003).

## **5.4.2. Bioquímica sanguínea**

### **5.4.2.1. Como se colecta la sangre para bioquímica sanguínea**

Para estimar el nivel de sustancias bioquímicas en la sangre, se determina generalmente su nivel en el plasma o suero. La mayoría de los bioquímicos prefieren hacer determinaciones empleando suero, ya que el suero no contiene ningún anticoagulante que pueda extraer agua de las células, como en el caso del plasma, por lo que este se diluye, y los niveles de las sustancias bioquímicas en el plasma tienden a ser un poco más bajos que en el suero. Además de que algunos anticoagulantes pueden interferir también con las determinaciones de algunas sustancias y, por último es más probable que el plasma se hemolice que el suero, interfiriendo con la determinación de algunas analitos <sup>37</sup>.

Para la conservación de la muestra se emplean anticoagulantes apropiados para algunas determinaciones como fluoruro para la medición de glucosa sanguínea y heparina para la insulina <sup>38</sup>.

El uso del EDTA altera la medición de calcio y el citrato de sodio al 3.8% no se recomienda para determinaciones bioquímicas, ya que su proporción es de 1:9 con la sangre, causando una dilución del 10% de la muestra.

Para obtener una muestra de plasma:

La sangre debe ser colectada en tubos de ensayo de vidrio, limpios y secos, los que deben contener algún anticoagulante que no interfiera en las determinaciones de los analitos que se quieren medir, se recomienda utilizar los tubos de vidrio con vacío que existen el mercado. Es importante mezclar bien la sangre con la cantidad apropiada de anticoagulante para evitar que esta se coagule <sup>38</sup>.

Para obtener una muestra de suero:

Una vez colectada la sangre esta debe ser depositada en tubos de ensaye de vidrio secos y limpios y sin anticoagulante (tubos de vidrio con vacío de tapón color rojo). También existen en el mercado unos tubos de vidrio con un gel acelerador de la coagulación el cual va a ayudar a que se separe mas fácilmente el coágulo del suero. Una vez que la sangre es puesta en el tubo, se debe evitar agitarlo, con el fin de permitir la formación de coágulo (aproximadamente 20 minutos), y evitar la hemólisis<sup>22,37</sup>.

Es importante mencionar que la cantidad de suero que obtiene es alrededor del 40% del volumen original de sangre<sup>38</sup>.

#### **5.4.2.2. Obtención del plasma y suero**

**Plasma:**

Una vez tomada la muestra de sangre esta debe ser refrigerada para su transporte, o hasta que se haga la separación del plasma de la sangre en una nevera portátil con hielo seco o picado. El plasma debe de ser separado del paquete celular lo más rápido posible para evitar hemólisis y la alteración de los resultados.

El tubo que contiene sangre con anticoagulante se debe centrifugar a 1500-2000 r.p.m. durante 10 a 15 minutos para separar las células del plasma. El plasma, que constituye la capa más externa, se puede extraer empleando una pipeta Pasteur y se transfiere a un tubo de almacenamiento. Se debe tener mucho cuidado para no alterar la capa celular, por lo que la pipeta no se debe poner demasiado cerca de la capa de células ya que la succión puede alterar y extraer cierto número de células que podrían alterar las determinaciones bioquímicas. Para esto se recomienda centrifugar nuevamente este sobrenadante y repetir el paso anterior, obteniendo el plasma con menos células interferentes<sup>38</sup>.

**Suero:**

Para su transporte y conservación se debe esperar la retracción del coágulo (aproximadamente 20-30 minutos), sin embargo lo más recomendable es esperar 1-2 horas a temperatura ambiente. Después de la retracción del coágulo, la muestra debe de ser refrigerada a 4°C para su transporte o hasta que el suero sea separado del paquete celular (tratando de que esto sea lo más pronto posible para evitar la hemólisis), colocándola en una nevera portátil con hielo seco o picado <sup>38</sup>.

El tubo que contiene sangre con el coágulo ya formado, se debe centrifugar a 1500 r.p.m. durante 10 minutos para separar las células del suero. Luego con una pipeta Pasteur se debe separar el suero o sobrenadante y transferir a un tubo de almacenamiento. En el caso de no contar con una centrífuga se debe dejar que el coágulo se forme bien y se separe el suero, el cual debe ser tomado con una pipeta con cuidado de no succionar las células y transferirlo a un tubo de almacenamiento <sup>38</sup>.

También se recomienda, como en el caso del plasma, centrifugar nuevamente el suero y obtenerlo libre de células que puedan interferir en las determinaciones <sup>38</sup>.

Las muestras de sangre para obtener suero o plasma, no deben ser conservadas mas de 6 horas en refrigeración sin ser separados de los demás componentes sanguíneos; porque esto trae como consecuencia alteración en los diferentes metabolitos de la sangre a determinar y por lo tanto errores en los resultados del laboratorio <sup>38</sup>.

**5.4.2.3. Conservación y tiempo para procesar el plasma y suero**

Las muestras de suero o plasma previamente separadas de las células, pueden conservarse a temperatura ambiente (20-30°C) durante un día sin que se

deterioreen, si la muestra es refrigerada a 4°C se puede conservar hasta por 4 días y si se congela (de -15 °C a - 20 °C) por semanas, meses o indefinidamente. Es importante congelar la muestra en tubos apropiados, que resistan la congelación, no de vidrio por que se rompen <sup>22, 36</sup>.

#### 5.4.2.4 Información que proporciona la bioquímica sanguínea

El examen bioquímico sirve para medir el nivel de varias sustancias como metabolitos (urea, creatinina), enzimas (Alanina amino transferasa (ALT), Aspartato amino transferasa (AST) y Fosfatasa alcalina (FA), y electrolitos (Na, K, Cl y HCO<sub>3</sub>) que se encuentran en la sangre <sup>37</sup>.

#### 5.4.3. Examen bacteriológico (Hemocultivo)

##### 5.4.3.1. Como se colecta la muestra de sangre

La sangre para su estudio bacteriológico se debe recoger en primer lugar si es que la sangre también se va a ocupar para otros estudios, para minimizar el riesgo de contaminación de la muestra con las bacterias del ambiente <sup>37</sup>. La sangre para este tipo de estudio será colectada en tubos con anticoagulante EDTA<sup>32</sup> o bien con citrato de Na al 3.8 %, el cual es el más recomendado, especialmente para el cultivo de *Brucella spp*, debido a que su efecto bactericida es menor que el de EDTA (com pers María Antonieta Mojica)<sup>3</sup>. También se puede utilizar el medio bifásico Ruiz castañeda para recuperar *Brucella*. Para recuperar *Leptospira* se recomienda colectar la sangre con heparina. Es importante evitar la hemólisis de la muestra <sup>39</sup>

Es importante realizar un frotis sanguíneo el cual se puede teñir en campo con tinción de Gram, Wrigth, con tinción monocromática o con cristal violeta para

<sup>3</sup> MVZ María Antonieta Mojica. FMVZ-UNAM Depto. De Microbiología. Noviembre, 2004

Ántrax, con Giemsa o Jiménez para chlamidopylas. También se pueden secar al aire y tefir en el laboratorio. Los frotis se deben conservar a temperatura ambiente.

Para el cultivo de bacterias anaerobias ver Anexo 12

#### **5.4.3.2. Como se conserva la muestra**

La muestra se debe mantener en refrigeración (4°C). Esto puede lograrse utilizando hielo o refrigerantes en cajas de poliuretano. No congelar <sup>39</sup>.

#### **5.4.3.3. Tiempo para procesar la muestra**

Una vez colectadas las muestras deben enviarse idealmente dentro de las primeras 24 horas al laboratorio en refrigeración <sup>39</sup>.

#### **5.4.3.4. Información que proporciona el hemocultivo**

El examen bacteriológico sirve para detectar e identificar cualquier bacteria que pueda estar presente en la sangre <sup>37</sup>.

De acuerdo al tipo de tinción que se utilice en los frotis se puede identificar una bacteria específica como el Ántrax cuando se usa la tinción de cristal violeta, pero si se ocupa una tinción de gram sólo se puede saber si son gram + o - y la identificación se hace de manera mas general.

#### **5.4.4. Examen parasitológico**

El diagnóstico parasitológico se puede realizar por la observación del parásito en sangre y por serología (ver capítulo de serología, página 55).

##### **5.4.4.1. Como se colecta la muestra de sangre para la observación de los parásitos**

Se debe colectar sangre en tubos de ensaye o frascos estériles con anticoagulante (EDTA) tubos que se venden comercialmente de tapa color morada. Debe agitarse lentamente para que se homogeneice con el anticoagulante, ya que se debe evitar la hemólisis de la muestra <sup>40</sup>.

Otra forma de obtener muestras es con la realización de frotis sanguíneos (como se explicó en el punto 5.4.1.5.1), para lo cual es preferible hacerlos con sangre capilar o periférica ya que en esta existe una mayor concentración de células infectadas en estos vasos. La sangre tomada de la vena cefálica no es satisfactoria, salvo en infecciones severas, porque hay una gran dilución de células infectadas <sup>32,41</sup>.

##### **5.4.4.2. Como se conserva la muestra de sangre para la observación de los parásitos**

La sangre se puede enviar al laboratorio en refrigeración, en cajas de poliuretano. No se deben de congelar, por que las bajas temperaturas pueden causar hemólisis y los parásitos intracelulares no podrán ser identificados <sup>32,40</sup>.

El frotis debe se conservado de la manera como fue descrita en el punto 5.4.1.5.1.

### **5.4.4.3. Tiempo para procesar la muestra**

La sangre con EDTA, se puede mandar al laboratorio en las condiciones arriba mencionadas durante las primeras 24 horas<sup>32</sup>.

El frotis es una muestra que se puede conservar viable para analizar por un largo periodo de tiempo.

### **5.4.4.4. Información que proporciona**

El examen parasitológico sirve para detectar e identificar la presencia de cualquier parásito sanguíneo a través de su observación en el frotis sanguíneo<sup>37</sup>.

### **5.4.5. Examen virológico**

Hay dos tipos generales de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico viral:

- 1) Aislamiento viral
- 2) Serología (ver el punto 5.4.8. de serología)
- 3) PCR (ver el punto 5.4.10 de genética)<sup>42</sup>

#### **5.4.5.1. Como se colecta la muestra para aislamiento viral**

Colectar la muestra asépticamente de preferencia durante la etapa febril de la enfermedad, desinfectando la piel y con material estéril. Se debe colectar sangre en tubos con EDTA (tubos con tapón de color morado). Se pueden adicionar 10 000 U.I. de penicilina y 10mg de estreptomicina por mililitro de la muestra<sup>32</sup>.

#### **5.4.5.2. Como se conserva la muestra para aislamiento viral**

La sangre debe ser enviada al laboratorio en refrigeración <sup>32</sup>.

#### **5.4.5.3. Tiempo para procesar las muestras para aislamiento viral**

La sangre debe enviarse al laboratorio en un tiempo máximo de 12 horas.

#### **5.4.5.4. Información que proporciona**

El aislamiento viral tiene por objetivo la recuperación e identificación específica del agente causal <sup>42</sup>.

#### **5.4.6. Examen toxicológico.**

Este se puede realizar en sangre y suero, de acuerdo al tóxico que se desea analizar. (Anexo 7)

##### **5.4.6.1. Como se colecta la muestra de sangre para el diagnóstico toxicológico.**

###### **Sangre:**

Se puede colectar sangre completa en tubos con EDTA (Tubos de tapa color morada), siendo el anticoagulante preferido. La heparina es aceptable en algunos casos, pero esta tiende a descomponerse, resultando en una coagulación de la muestra y arruinando la prueba <sup>43</sup>.

Se recomienda hacer un conteo completo de las células sanguíneas y un análisis químico del suero sanguíneo, para descartar algunas causas de enfermedades que pueden confundirnos en el diagnóstico de algunas toxinas <sup>43</sup>.

**Suero:**

La muestra de suero sanguíneo para el examen toxicológico se obtiene de la manera como se describe en el punto 5.4.2. de bioquímica sanguínea (pag 43)

**5.4.6.2. Como se conserva la muestra**

Las muestras para toxicología se deben mandar en congelación <sup>44</sup>. (Anexo 7)

Es necesario consultar con el personal del laboratorio en lo referente a los procedimientos óptimos de acuerdo al tóxico de interés <sup>44</sup>.

**5.4.6.3. Tiempo para procesar la muestra**

En congelación las muestras duran indefinidamente

**5.4.6.4. Información que proporciona**

El examen toxicológico sirve para detectar y determinar la concentración de diferentes sustancias tóxicas en la sangre.

## **5.4.7. Análisis nutricional**

### **5.4.7.1. Como se colecta la muestra**

Las muestras se obtienen desde alguna vena en tubos con EDTA de 3.0 o 5.0 ml, la muestra debe ser por lo menos de 1 ml de sangre para el análisis de ácidos grasos, y con tubos con gel acelerador de la coagulación para los estudios de vitaminas y minerales, para este análisis se requieren 8 ml de sangre para obtener 3 a 4 ml de suero sanguíneo <sup>45</sup>.

La forma de cómo se obtiene el suero se describe en el punto 5.4.2 de bioquímica sanguínea (pag 43)

### **5.4.7.2. Como se conserva la muestra**

El suero y la sangre entera se deben conservar en congelación (en congelador o nitrógeno líquido) hasta su análisis en el laboratorio <sup>45</sup>.

### **5.4.7.3. Tiempo para procesar la muestra**

Al estar congeladas las muestras su conservación es por varios años ya que las células sanguíneas y los componentes del suero se mantienen en criopreservación <sup>45</sup>.

### **5.4.7.4. Información que proporciona**

Este tipo de análisis sirve para determinar las concentraciones de los nutrientes específicos (vitaminas, minerales, ácidos grasos) circulantes en el organismo del animal, y así conocer su nivel nutricional <sup>45</sup>.

## **5.4.8. Examen serológico**

### **5.4.8.1. Como se colecta la muestra**

La colección de sangre se realizará en tubos al vacío sin anticoagulante que por convención tienen tapón rojo, y vienen en capacidades de 3.0, 5.0, 7.0 y 10.0 ml. Estos tubos son de vidrio o plástico neutros protegidos con silicona para evitar la hemólisis y facilitar la retracción del coágulo y poder obtener el suero. La manera de cómo se obtiene una muestra de suero a partir de sangre entera se describe en el punto 5.4.2 de bioquímica sanguínea (pág. 43)<sup>38</sup>.

### **5.4.8.2. Como se conserva la muestra**

El suero se puede mantener a temperatura ambiente, en refrigeración o en congelación dependiendo del tiempo que se vaya a tardar su análisis en el laboratorio<sup>38</sup>.

### **5.4.8.3. Tiempo para procesar la muestra**

La muestra de suero previamente separada de las células, puede conservarse a temperatura ambiente (20-30°C) durante un día sin que se deteriore, si la muestra es refrigerada a 4°C se puede conservar hasta por 4 días y si se congela (-15°C a -20°C) por semanas, meses o indefinidamente<sup>22, 38</sup>.

### **5.4.8.4. Información que proporciona**

La serología sirve para identificar el nivel de anticuerpos específicos en la sangre contra agentes parasitarios e infecciosos que incluirán<sup>17,37,42</sup>:

- Agentes Virales

Leucemia Felina – (FeLV)\*

Peritonitis Infecciosa felina (coronavirus) – (FIP)

Calicivirus (FCV)

Rinotraqueítis felina (Herpesvirus) – (FHV)

Panleucopenia felina (parvovirus) – (FPV)

Virus de la inmunodeficiencia felina (FIV)

Lentivirus del Puma

Moquillo canino (CDV)

Pseudorabia

Rabia

\* Las siglas en paréntesis son los nombres de las enfermedades en inglés

- Agentes bacterianos

Leptospirosis

*Bartonella henselae*

*Hemobartonella felis*

Listeriosis

Salmonelosis

Pneumonia felina

Tuberculosis

Pneumonitis felina (*Chlamydophila felis*)

- Infecciones parasitarias

*Toxoplasma gondii*

Babesiosis

*Dirofilaria immitis*

*Cytauxzoon felis*

Tripanosomiasis

## **5.4.9. Análisis hormonal**

### **5.4.9.1. Como se colecta la muestra**

La sangre se colecta en tubos al vacío sin anticoagulante que por convención tienen tapón rojo, y vienen en capacidades de 3.0, 5.0, 7.0 y 10.0 ml, de vidrio o plástico neutros protegido con silicona para evitar la hemólisis y facilitar la retracción del coágulo y poder obtener el suero. La obtención del suero se describe en el punto 5.4.2 de bioquímica sanguínea <sup>38</sup>.

### **5.4.9.2. Como se conserva la muestra**

La muestra se mantiene en congelación (-15°C a -20°C) hasta su análisis en el laboratorio <sup>38</sup>.

### **5.4.9.3. Tiempo para procesar la muestra**

Semanas, meses o indefinidamente <sup>22,38</sup>.

### **5.4.9.4. Información que proporciona**

Este análisis es útil para medir niveles hormonales (ej. Cortisol, testosterona, estrógenos, progesterona) en sangre <sup>17</sup>.

## **5.4.10. Análisis genético**

La sangre es una fuente excelente de ADN que está presente en los leucocitos <sup>46</sup>.

### **5.4.10.1 Como se colecta y conserva la muestra**

Habitualmente se utiliza sangre periférica, las muestras de sangre se colectan en tubos con anticoagulante EDTA, de preferencia. La muestra se conserva en refrigeración a 4°C <sup>46,47</sup>.

### **5.4.10.2. Información que proporciona**

Sirve para la extracción del ADN, por medio de la cual se puede obtener la identificación individual del felino, determinar la especie, el sexo para estimar el tamaño de la población, la distribución y variación genética, todos ellos indicadores de salud poblacional <sup>48,49</sup>.

### **5.4.10.3. Técnica del Filtro**

#### **a) Información que proporciona**

Se pueden coleccionar pequeños volúmenes de sangre en papel de filtro para su posterior análisis de ARN, ADN viral, bacteriano o hemoparasitológico <sup>50</sup>.

#### **b) Como se colecta**

- Se deben colocar gotas de sangre entera sobre el papel de filtro grueso, tipo Whatman, hasta formar manchas de 1 a 2 cm de diámetro. Life Technologies® vende papel de filtro preparado para este uso, bajo el nombre de Fitzco/Whatman, FTA # 8504.
- Las manchas de sangre se pueden lograr también presionando el papel contra un órgano o músculo.

Antes de su uso, o luego del secado de las muestras de sangre, se puede rotular el papel de filtro con lápiz, con el nombre de la especie, número o letras de identificación y la fecha <sup>50</sup>.

**c) Como se conserva**

Luego de secar las manchas de sangre (muestras) sobre el papel a temperatura ambiente, se pueden conservar los papeles en bolsas plásticas individuales autosellables, en un ambiente seco. Se recomienda agregarle un pequeño paquete de sílica gel a cada bolsita para garantizar la ausencia de humedad en la muestra <sup>50</sup>

## **6. MUESTRA DE HECES.**

### **6.1. Obtención de las muestras fecales**

Las mejores muestras son las que se pueden tomar directamente del recto para evitar la contaminación de las mismas. Se puede utilizar una varilla de vidrio o una cuchara para muestreo de heces, o bien se recogen después de que el animal haya defecado sobre una superficie limpia o mediante enemas (lavado intestinal)<sup>29,51</sup>.

Muchas veces el animal defeca en las jaulas de captura o de transporte, de donde se puede recolectar la muestra. Aunque no es lo óptimo, puede ser de gran utilidad, especificando que la muestra fue obtenida del suelo para tenerlo en cuenta al momento de interpretar los resultados <sup>51</sup>.

### **6.2. Tipos de análisis a partir de muestras de heces**

#### **6.2.1. Estudio parasitológico**

##### **6.2.1.1. Heces completas**

###### **a) Como se colecta la muestra**

Una vez que se ha obtenido la muestra debe colocarse en un recipiente plástico limpio y de boca ancha <sup>51</sup>.

## **b) Conservación de la muestra y tiempo para procesar**

No se requerirá conservador si las muestras se van a trabajar inmediatamente después de la colección. La refrigeración (2-4°C), puede ser utilizada para la observación de algunos parásitos como nemátodos, taenias y coccidias, ya que estos se pueden adaptar para sobrevivir en el ambiente por periodos más largos ( $\leq 1$  semana), sin embargo las muestras refrigeradas no sirven para la evaluación de protozoarios flagelados (Giardia, Trichomonas y Cryptosporidia) ya que las heces deben ser frescas ( $\leq 1$  hora), para poder observar estos parásitos, por lo que se recomienda consultar con el laboratorio sobre el manejo de los especímenes fecales colectados<sup>22,29,51</sup>.

En el caso de que no se cuente con refrigeración puede adicionarse una solución de formol al 10%, en una proporción de una parte de formol por 4 partes de heces<sup>40</sup>; o bien una parte de formol por una parte de heces<sup>29</sup>.

Si se va a postergar más de 3 semanas el transporte de las muestras al laboratorio se puede adicionar formalina al 5% a las heces para preservar más parásitos (verificar con el laboratorio antes) y almacenarlo a temperatura ambiente. Adicionar el volumen de formalina equivalente o igual al del volumen de las heces y mezclarlas completamente con un instrumento limpio<sup>22,44</sup>.

Si las muestras son enviadas para el diagnóstico de parásitos pulmonares y coprocultivos no debe utilizarse formol para su conservación, únicamente conservar la muestra en refrigeración<sup>29,40</sup>.

## **c) Información que proporciona**

La muestra sirve para evaluación de parásitos gastrointestinales y protozoarios flagelados, enzimas en heces, sangre oculta y algunos antígenos<sup>51</sup>.

### 6.2.1.2. Parásitos observados macroscópicamente

#### a) Como se colecta y conserva la muestra

Si se llegan a encontrar nemátodos o céstodos visibles, estos deben ser lavados con agua tibia y se colocarán estirados entre dos portaobjetos, se unirán con ligas y se meterán en frascos con formol al 10% o alcohol al 70% (Figura. 10), o solo se lavan y después se colocan en frascos con alcohol al 70% o formol al 10% y se almacenan a temperatura ambiente para ser enviados al laboratorio <sup>27</sup>.

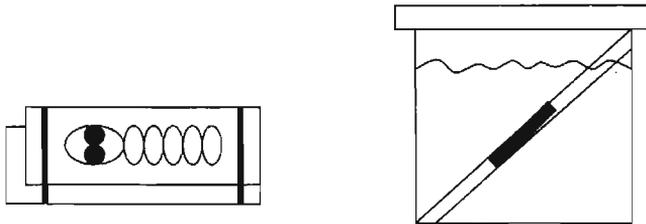


Figura. 10 Conservación entre dos portaobjetos de los parásitos visibles macroscópicamente, encontrados en las heces.

#### b) Tiempo para procesar la muestra

Los parásitos conservados en formol o alcohol, pueden durar largos periodos.

### 6.2.1.3 Frotis Fecal

#### a) Como se realiza.

Con un hisopo limpio tomar una pequeña muestra de heces frescas, untarlo gentilmente a lo largo del centro del portaobjetos y permitir que seque al aire. La capa debe ser ligera, para una mejor observación. Colocar el hisopo dentro de un contenedor de plástico. Etiquetar el hisopo y el portaobjetos <sup>22</sup>.

**b) Como se conserva**

No refrigerar, secar al aire y guardar a temperatura ambiente. Se puede fijar con calor para una mayor preservación pasando lentamente el portaobjetos sobre una flama de butano 5 veces.

**c) Tiempo para procesar**

El frotis es una muestra que se puede conservar viable para analizar por un largo periodo de tiempo <sup>22</sup>.

**d) Información que proporciona**

Sirve para la observación visual de la flora bacteriana intestinal, protozoarios y presencia de microorganismos anormales (ej. Hongos) <sup>22</sup>.

**6.2.2 Cultivo bacteriológico (coprocultivo)****6.2.2.1. Como se colecta**

Las muestras deben colectarse bajo estrictas condiciones de asepsia. Tanto el material de colección como el recipiente en que la muestra sea transportada deberán ser estériles y de preferencia debe de ser con tapa rosca. La muestra contenida en frascos no se debe dejar a temperatura ambiente por el riesgo de explosión por la fermentación de la muestra. También se puede tomar la muestra utilizando un hisopo estéril de preferencia con medio de transporte (Ej; Culturette). Introduciendo el hisopo en el recto, rotarlo haciendo contacto sobre la mucosa rectal, se retira y se introduce en un tubo estéril <sup>32,40,51</sup>.

Para el cultivo de bacterias anaerobias ver Anexo 12

### 6.2.2.2. Conservación de la muestra y tiempo para procesar

Enviar al laboratorio la muestra fresca para trabajarse durante las dos primeras horas. En el caso de que la muestra demore un mayor tiempo (12- 24hrs) se le puede adicionar solución salina fisiológica estéril (1-2ml para los hisopos) y mantenerla en condiciones de refrigeración (4°C), utilizando hielo o refrigerantes en cajas de poliuretano <sup>32,40,51</sup>.

Cuando la muestra sea colectada en hisopos hay peligro de desecación, por ello estos deben enviarse de preferencia en medios de transporte como Stuart, Carry-Blair, etc, que contienen algunos componentes (péptidos, azúcares, aminoácidos) que ayudan a la preservación de la bacteria pero no a la multiplicación <sup>40</sup>.

Los hisopos de cultivo bacteriológico son vendidos en paquetes estériles que incluyen el medio de transporte dentro del cual se usa para conservar la muestra en el hisopo. Algunos pueden incluir carbón de activado en el medio, el cual absorbe las toxinas bacterianas y es particularmente útil si se va a demorar más el transporte al laboratorio <sup>22</sup>.

### 6.2.2.3. Información que proporciona

- Identificar bacterias del tracto intestinal para confirmar las enfermedades causadas por estas.
- Una vez cultivadas las bacterias se pueden probar varios antibióticos para ver cual es el más efectivo, lo cual será de mucha utilidad en el caso de que sea necesario llevar a cabo un tratamiento antimicrobiano<sup>22</sup>.

### **6.2.3. Estudios de hábitos alimenticios**

Para analizar los hábitos alimenticios y la calidad de la dieta son usadas frecuentemente las heces. En los carnívoros se recuperan e identifican las piezas de presa no digeridas que se encuentren en las heces. Los hábitos alimenticios también se pueden analizar con estudios genéticos (ver la sección de genética) <sup>52</sup>.

#### **6.2.3.1. Conservación de la muestra y tiempo para procesar**

Dicho estudio se puede hacer directamente en campo. Las muestras fecales se desintegran manualmente y se remojan durante 24 horas en agua y detergente, una vez suaves se lavan en un colador, se escurren y se dejan secar a temperatura ambiente.

Los componentes encontrados en las muestras (pelos, escamas, dientes, plumas) serán separados e identificados con ayuda de colecciones zoológicas y literatura <sup>53,54</sup>.

La identificación correcta de las excretas cuando se localizan en campo es fundamental por que de eso dependen los resultados al estudiar la dieta. En el caso de excretas de felinos las excretas se puede identificar por: (a) la forma de las huellas asociadas en el lugar donde estaban las heces, (b) huellas en el área de ubicación del felino, y (c) cuando no había huellas por el diámetro máximo de las excretas, siendo un parámetro válido, considerándose como felino grande o pequeño <sup>54</sup>.

#### **6.2.3.2. Información que proporciona**

Sirve para conocer la dieta y ecología trófica de los felinos <sup>54</sup>.

## **6.2.4. Análisis genético**

### **6.2.4.1. Conservación de la muestra y tiempo para procesar**

Cada muestra debe ser secada al aire sobre papel estéril puesto en una malla fina de alambre. La malla se debe rociar con etanol para esterilizarla con fuego antes de colocar la siguiente muestra. La muestra seca debe ser medida, posteriormente pulverizada y tamizada, separando el polvo de los remanentes de presas. La presa se identifica examinando dientes, huesos, garras, pelo y otros restos. El polvo debe ser almacenado en bolsas autosellables nuevas en un lugar seco y oscuro durante todo el trabajo de campo, si el almacenamiento es por un año o mas debe ser en un cuarto con aire acondicionado. También se pueden colocar las heces en alcohol al 70 o 95% y conservadas a temperatura ambiente para realizar análisis de DNA <sup>17,55</sup>.

### **6.2.4.2. Información que proporciona**

Las técnicas moleculares aplicadas a heces permiten la identificación de la especie animal a través de una secuencia DNAMt, la identificación individual, relación filogenética del individuo ó el sexo, secuencias patógenas (virus, bacterias, protozoarios y parásitos) para identificar enfermedades ó hábitos alimenticios (utilizando pedazos de plantas o animales que se encuentren en las heces). Además los muestreos de heces en una área nos permitir estimar, el tamaño del territorio, el ámbito hogareño, patrones reproductivos, estructura y tamaño de la población. Los marcadores genéticos también pueden ser usados para estudios de paternidad ó variación genética en la población <sup>52</sup>.

## **6.2.5 Análisis hormonal**

### **6.2.5.1. Como se conserva y tiempo para procesar**

Las muestras pueden ser conservadas en congelación (- 20°C) o con suficiente etanol al 95% para cubrir la muestra en inmersión y guardada a temperatura ambiente a 22°C <sup>17,56</sup>.

La concentración de hormonas esteroides cuantificables en heces no son alteradas significativamente por la preservación en etanol al 95% o al 70% y almacenadas a temperatura ambiente por lo menos 14 días antes de la liofilización y extracción o por la congelación <sup>17,56</sup>.

### **6.2.5.2. Información que proporciona**

El análisis de esteroides fecales es una fuerte herramienta que puede proveer información sobre la salud, fisiología, estado reproductivo (gestación, ovulación, función lútea) y actividad adrenocortical (estrés) de las especies silvestres. Además el análisis de esteroides fecales puede proporcionar información del sexo y la edad de los animales <sup>52,56</sup>.

## **6.2.6 Análisis químicos y toxicológicos**

### **6.2.6.1. Como se colecta la muestra**

Las muestras deberán obtenerse exentas de contaminación y residuos químicos y su descomposición debe detenerse lo más pronto posible. Deben de colocarse en bolsas o en frascos de plástico, que sellen herméticamente; se

desaconsejan las bolsas de plástico para la basura. También es importante evitar la contaminación de las muestras con antisépticos, jabones, polvo, pelo o cualquier otra sustancia extraña o poner en contacto directo con la muestra materias absorbentes como algodón, gasas, tejidos, papel, etc, que desecan las muestras <sup>18,57,58</sup>. (Anexo 7)

### **6.2.6.2. Como se conserva la muestra**

Las muestras de heces para análisis toxicológico se mantienen en congelación y deben ser envasadas de forma que lleguen al laboratorio manteniéndose congeladas <sup>18,57,59</sup>.

Después de la congelación la siguiente forma de conservación es con formaldehído ya que este altera la medición algunas sustancias, por lo que se debe tomar en cuenta que tóxico se quiere medir <sup>57,18</sup>.

### **6.2.6.3. Información que proporciona**

El estudio toxicológico sirve para estudiar el impacto de la contaminación ambiental en felinos silvestres <sup>60</sup>. Es necesario especificar la sustancia que se desea identificar o cuantificar, en heces es posible medir tóxicos como arsénico, cobre, plomo, mercurio, talio, cromo o cobalto y petróleo, entre otros <sup>18,61</sup>. (ver Anexo 7)

## 6.2.7. Análisis virológico

### 6.2.7.1. Conservación de la muestra

Las muestras de heces para análisis viral requieren de 5 a 10 gramos de material. Estas deben ser congeladas preferentemente a  $-70^{\circ}\text{C}$  (hielo seco) pero también se pueden conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  (congeladores comunes). Enviarlas al laboratorio de modo que en el camino no se deshieren. El envase más conveniente para la remisión de muestras fecales es un frasco de boca ancha estéril con capacidad de 90 a 120ml y tapa de rosca que permita el cierre hermético. Se debe usar viales o tubos de plástico diseñados para ser almacenados a esa temperatura.<sup>17,59,50</sup>

Gallegos (1985) dice que las muestras pueden ser enviadas en refrigeración si las muestras van a ser trabajadas durante las primeras 3 horas. Si forzosamente tiene que permanecer algún tiempo a temperatura ambiente, es necesario un medio de conservación como la solución estéril de Hank (pH 7.2), la cual contiene: albúmina bovina al 10% o hidrolizado de lactoalbúmina al 0.5%, 500 U.I. de penicilina G potásica, 500mg sulfato de estreptomycin y 500 U sulfato de polimixina por mililitro de solución. Esta se agrega a partes iguales con la muestra. Es necesario romper el excremento para que la solución conservadora pueda penetrar. Las muestras se envían al laboratorio en refrigeración durante las primeras 12 horas<sup>32</sup>. Existen medios comerciales de transporte para cultivo virológico los cuales traen incluida la solución de Hank.

#### *Hisopos rectales.*

Los hisopos se usan para obtener la muestra directamente del recto, se pone en un tubo con tapa que contenga un medio disponible comercialmente para tal fin y si no se dispone de este se usa solución salina fisiológica. Se corta el

## 7. MUESTRA DE ORINA

Para poder obtener una muestra de orina hay que considerar que el animal debe tener la vejiga pletera, por lo que muchas veces no es posible coleccionar la muestra, por que no siempre hay la cantidad necesaria de orina en la vejiga. Por tanto la coleccion de orina es considerada una técnica secundaria en medicina veterinaria y particularmente en fauna silvestre usada para proveer información extra que no puede ser obtenida de la muestra de sangre,<sup>62</sup>.

### 7.1 Como se colecciona la orina

Los métodos más comunes de obtención de las muestras son:

a) Colección directa.

Se recomienda que la muestra se tome de la parte media del chorro ya que la primera fracción puede arrastrar componentes de la uretra o del tracto genital. Estas muestras pueden obtenerse durante la micción espontánea o mediante alguna estimulación manual a través de la pared abdominal, masaje perineal o vulvar<sup>63,64</sup>.

Muchas veces cuando los felinos se están recuperando de la anestesia, se orinan dentro de la transportadora, de donde se puede obtener la muestra, que no sea la ideal pero si de gran utilidad.

b) Cateterización:

Es la técnica de coleccion mediante el empleo de una sonda o catéter a través de la uretra hasta la vejiga urinaria. La cateterización debe ser realizada de

una manera aséptica, sin causar algún trauma. La cateterización en felinos silvestres es muy difícil sin anestesia general<sup>62,63,64</sup>.

c) Cistocentésis:

Es la punción de la vejiga urinaria con una jeringa a través de la pared abdominal. Para realizarse debe localizarse la vejiga por palpación y contener orina en su interior, de otro modo se dificulta el desarrollo de la técnica y se corre el riesgo de causar algún daño. Esta técnica requiere la inserción de una aguja de 22G con jeringa a través de la pared ventral en un ángulo de 45° hasta el interior de la vejiga llena, cerca de la unión con la uretra. La piel debe limpiarse y desinfectarse y la vejiga inmovilizarse con los dedos, aunque sin oprimirla. La técnica puede provocar traumatismo o hemorragia en la pared abdominal u órganos internos, o puede liberar orina de la vejiga urinaria. Si la esterilidad es escasa podría haber una infección del tracto urinario, o incluso peritonitis<sup>37,63</sup>.

La forma de obtención de la muestra influye sobre los resultados una vez que se realizan las pruebas correspondientes, por ello es muy importante que se tenga en cuenta el método de colección que fue empleado<sup>63</sup>.

Los recipientes para coleccionar y transportar las muestras deben estar químicamente limpios, de ser posible estériles, con cierre hermético y preferentemente que impidan el contacto con la luz, ya que esta produce degradación de algunos constituyentes<sup>29,63</sup>.

## 7.2. Tipos de análisis posibles a partir de muestras de orina

### 7.2.1. Urianálisis

Los tres principales componentes de un análisis urinario son:

- 1.- Examen físico: que incluye la medida del volumen de orina, un registro de su apariencia (color, transparencia y olor) y la determinación de su densidad utilizando un refractómetro.
- 2.- Examen químico: El pH urinario y el nivel de los constituyentes químicos de la orina pueden determinarse con tiras reactivas comerciales.
- 3.- Examen del sedimento: En el examen del sedimento se pueden observar leucocitos, eritrocitos, células epiteliales, cilindros, cristales, bacterias, hongos, espermatozoides, fases evolutivas de parásitos y grasa <sup>37,63</sup>. Para su evaluación se necesita un microscopio.

#### a) Como se conserva

Una vez que se ha obtenido la muestra debe ser analizada lo más pronto posible. En ningún caso se recomienda que sea después de 2 horas y manteniendo la muestra a temperatura ambiente. Si no se va a cumplir esta condición, es necesario refrigerarla y realizar el análisis dentro de las primeras 4 - 6 horas. Si es necesario mantener las muestras por más tiempo se deberá dividir la muestra en 2 porciones y cada una se conserva de la siguiente forma:

-Formalina amortiguada al 40%, y se utiliza para el examen del sedimento. Se agrega una gota por cada 20ml de orina, su uso es para conservar células y otros componentes del sedimento. Produce cambios pequeños en el Ph e interfiere con algunas determinaciones químicas en los resultados de las tiras reactivas comerciales <sup>63, 65</sup>.

Otros autores recomiendan usar conservadores como el tolueno, el cual se añade en suficiente cantidad de acuerdo al tamaño del recipiente para formar una película delgada en la superficie de la orina colectada. Este es el mejor preservativo en la mayoría de las determinaciones de componentes químicos. También puede usarse el formol, el cual es el preferido para conservar los elementos figurados, se añaden una o dos gotas de formol (40%) por cada 30 o 40 ml de orina. Otro conservador utilizado es el timol que se añade en cantidad de 0.1g/100ml de orina, el cual es de uso general y puede dar falsos resultados positivos de albúmina. También se menciona el uso de ácido bórico y ácido metafosfórico, en el cual solo se debe cubrir únicamente la superficie de la muestra <sup>29,59</sup>.

El examen físico y químico de orina es rápido, sencillo y económico en comparación a otras pruebas. Por medio de una tira reactiva se pueden realizar el examen químico en el campo y con un refractómetro medir la densidad urinaria utilizando aproximadamente 1 ml de orina. El examen del sedimento se realiza generalmente en el laboratorio <sup>63</sup>.

## **b) Tiempo para procesar**

La congelación de la muestra en un recipiente hermético conserva la orina para determinaciones químicas casi indefinidamente. Por lo que este método puede utilizarse si se requiere realizar el examen físico o químico, pero dañará el sedimento y afectará las bacterias <sup>37,59</sup>.

El análisis de orina se debe completar sobre la orina de reciente recolección, las muestras refrigeradas son aceptables durante 4 - 6 horas <sup>63,65</sup>. Las muestras conservadas con formalina para el examen citológico a temperatura ambiente duran más de 6 horas.

### **c) Información que proporciona**

Un urianálisis completo sirve para obtener información sobre el estado de los riñones y la habilidad del animal para filtrar y excretar normalmente los metabolitos, lo cual proporciona información no sólo sobre el tracto urinario, si no también de otros sistemas corporales <sup>66,67</sup>.

## **7.2.2. Aislamiento bacteriológico y micológico**

### **a) Conservación y tiempo para procesar**

Los métodos de colección de orina por cistocentesis y cateterización se prefieren cuando la muestra es requerida para cultivo bacteriológico, especialmente la cistocentesis ya que se evita la contaminación de orina con bacterias. También se puede usar la muestra obtenida durante la micción a mitad de chorro <sup>51,64,66,68</sup>.

La muestra se debe coleccionar en frascos estériles, de cierre hermético y enviarla fresca al laboratorio para ser trabajada durante las 2 primeras horas después de colectada. En el caso de que la muestra demore un mayor tiempo, debe mantenerse en refrigeración y no se debe congelar <sup>32,51</sup>.

Para la toma y transporte de muestras bacteriológicas existen también equipos estériles en el mercado (por Ej., CULTURE-TUBE®<sup>4</sup>, CULTURETTE®<sup>5</sup>, PORTAGERM® Amies Agar<sup>6</sup>). Los medios de transporte (por ej. Stuart- MEDIUM) impiden el resecado del material y que los gérmenes de probable contaminación

---

<sup>4</sup> MTM Medical USA

<sup>5</sup> BD Diagnostic Systems

<sup>6</sup> Biomérieux Lab

sobrepasen a la flora patógena original. La supervivencia de las bacterias puede llegar en este medio hasta tres días<sup>33,69</sup>.

Es importante realizar también un frotis de la orina, el cual se puede teñir en campo con Wright, Giemsa o tinción de Gram o solo secarlo al aire y teñirlo en el laboratorio. Los frotis se conservan a temperatura ambiente.

Aunque no es lo óptimo, se puede realizar un sembrado en campo si no se puede mandar la muestra rápidamente al laboratorio. Este se debe hacer de la manera más estéril posible y cerca de un mechero. Es importante saber que tipo de bacterias queremos recuperar para saber que tipo de medio es útil para sembrar la muestra<sup>33</sup>.

Para el cultivo de bacterias anaerobias ver Anexo 12.

### **7.2.3. Examen parasitológico**

#### **a) Como se colecta la muestra**

La muestra debe ser colectada de preferencia por cateterización y/o cistocentesis<sup>64</sup>.

#### **b) Como se conserva**

Las muestras de orina para examen parasitológico deben ser preservadas con formol (2 gotas de formol al 40% por cada 30 o 40 ml de orina)<sup>59</sup>.

### **c) Información que proporciona**

Este análisis sirve para identificar huevos de parásitos presentes en la orina<sup>64</sup>.

#### **7.2.4. Aislamiento de riquetsias y virus**

##### **a) Como se colecta y conserva la muestra**

Las muestras destinadas al aislamiento de riquetsias y virus pueden enviarse de varias formas, refrigeradas en medio de transporte (caldo de triptosa, albúmina sérica, gelatina al 0.25%, glicerina al 50%, etc), o congeladas entre -40°C y 60°C, en recipientes isotérmicos con hielo seco. En este último caso es conveniente que el recipiente disponga de un pequeño orificio para la salida de los vapores de CO<sub>2</sub> producidos<sup>69</sup>.

En las muestras para aislamiento de virus deberán incorporarse antibióticos antibacterianos y antimicóticos (penicilina, estreptomycin, nistanina, anfotericina B) para evitar la multiplicación, en las muestras de bacterias y hongos<sup>69</sup>.

Por otra parte es necesario tener en cuenta que los vapores de CO<sub>2</sub> pueden crear un pH ácido en la muestra e inactivar algunos virus, por lo que es conveniente que el recipiente o bolsa en que se transporta la muestra esté perfectamente cerrado<sup>69</sup>.

##### **b) Tiempo para procesar**

Las muestras deben enviarse al laboratorio por un medio rápido de transporte, con el objeto de que no transcurran más de 24 horas desde la toma de las mismas hasta su procesamiento<sup>69</sup>.

## **7.2.5. Examen toxicológico**

### **a) Como se colecta**

La muestra de orina debe ser colectada en frascos de plástico, limpios y de cierre hermético. La cantidad de orina que se requiere para estudios toxicológicos es de 20 a 40ml <sup>18,43,58</sup>.

### **b) Como se conserva**

La muestra debe ser congelada a -20°C y envasada de forma que llegue al laboratorio congelada con el fin de evitar su descomposición. También se le puede adicionar a la muestra 0.1gr. de timol/100ml de muestra para conservarla por 24 horas (ver anexo 7) <sup>18,57,32,61</sup>.

### **c) Información que proporciona**

Algunas de las sustancias que se pueden medir en la orina son: arsénico, etilenglicol, fluoruros, mercurio, fenotiazinas, estricnina, talio, oxalatos, aflatoxinas, alcaloides, mioglobina, nitratos, drogas, herbicidas, magnesio, plantas y potasio entre otras <sup>18,43,61</sup>(ver Anexo 7).

### **d) Tiempo para procesar**

La congelación de la muestra en un recipiente hermético conserva la orina para determinaciones químicas casi indefinidamente <sup>59</sup>.

## **8. MUESTRA DE MUCOSAS, PIEL, PELO Y ECTOPARÁSITOS.**

### **8.1 Como se colecta el pelo**

#### **8.1.1. Raspado de piel**

##### **a) Como se colecta**

Para obtener una muestra representativa de la zona afectada es necesario obtenerla de la periferia de una lesión activa <sup>27,59</sup>.

Se debe limpiar muy bien el área afectada y el área periférica sana con solución salina fisiológica estéril, sin usar antisépticos. Es necesario retirar las costras y escamas que estén sobre la lesión y secar con una gasa estéril <sup>51</sup>.

El sitio de donde se obtendrá la muestra debe ser raspado repetidamente con un bisturí en dirección al crecimiento del pelo, hasta producir hemorragias puntiformes para asegurar la profundidad del raspado. Al bisturí se le puede poner un poco de glicerina para que el raspado se adhiera a la navaja y no se vuele. El primer raspado se desecha, el segundo es el que se utiliza para el diagnóstico <sup>27,5970</sup>.

##### **b) Como se transporta**

La muestra puede ser enviada entre dos portaobjetos fijados con una liga, en frascos pequeños y cerrados o en tubos de ensayo bien tapados. La muestra debe ser tomada de diferentes lugares y en cantidad suficiente <sup>27</sup>.

### **c) Tiempo para procesar**

El raspado dura largo periodo de tiempo.

### **d) Información que proporciona**

En estas muestras se investiga comúnmente presencia de ectoparásitos, ácaros, hongos, levaduras y bacterias <sup>51</sup>.

## **8.1.2. Cepillado de pelo o pelo arrancado**

### **a) Como se colecta**

Es la prueba diagnóstica dermatológica más simple y probablemente la más frecuentemente empleada, en el cual el pelo, las escamas y los desechos son retirados del animal afectado. Una vez cepillado el pelo del animal, el material y pelo que se desprende puede ser colocado y acumulado en el centro de un papel para examinarlo microscópicamente <sup>70</sup>.

Los pelos también pueden ser arrancados utilizando pinzas para ser examinados <sup>36</sup>.

### **b) Como se conserva**

El pelo arrancado de la periferia de la lesión sospechosa de dermatofitos deben enviarse en recipientes limpios que se mantengan secos durante el transporte. Los tubos de vacutainer y otros recipientes similares que puedan sellarse deben evitarse ya que en su interior tienden a formarse condensados que

permiten la población de contaminantes. Los sobres de papel limpios son recipientes adecuados. Para el transporte, el sobre debe empaquetarse en una envoltura más resistente <sup>36</sup>.

### **c) Información que proporciona.**

El pelo colectado de esta manera sirven para realizar tricoscopia, la cual permite saber en que fase del crecimiento del pelo se encuentra (anagen o telogen), al observar al microscopio la sección del bulbo del pelo. Si observa pelo deformado en la sección del cuerpo del pelo la lesión puede deberse a periodos de una nutrición no balanceada. También sirve para el diagnóstico e identificación de ectoparásitos y dematofitos identificando las hifas y artroesporas. La región de la punta del pelo puede proveer información que permita determinar si el pelo fue removido traumáticamente como en el caso de prurito ó causas psicogénicas <sup>70</sup>.

### **8.1.3. Cinta adhesiva**

#### **a) Como se colecta y conserva**

El lado adhesivo de una cinta de acetato de 10cm de longitud debe ser presionada repetidas veces en un área sospechosa para colectar parásitos superficiales. La cinta adhesiva será pegada sobre un cubreobjetos dejando atrapados entre ellos la muestra <sup>70</sup>.

La citología de una lesión puede también ser usada utilizando una técnica de tinción de la cinta adhesiva. El área lesionada será evaluada por simple presión del lado adhesivo de la cinta sobre la piel por unos segundos. El material será obtenido como una impronta <sup>70</sup>.

## **b) Información que proporciona**

Esta técnica sirve para la colección e identificación de ectoparásitos. También se pueden observar todo tipo de células, microorganismos patógenos y comensales siempre y cuando la preparación sea tratada con una tinción citológica adecuada modificada de Wright's (Diff- Quick) o Giemsa <sup>70</sup>.

## **8.2. Como se colecta una muestra de piel**

### **8.2.1 Biopsia de piel**

#### **a) Como se colecta**

El método más rápido y simple de tomar una biopsia de la piel, involucra el uso de una perforadora para piel.

Una vez anestesiado el animal, el sitio para obtener la muestra debe ser rasurado cortando en dirección del crecimiento del pelo. El sitio no debe ser lavado ni desinfectado, ya que el material diagnóstico podría ser removido de la superficie de la piel. Se puede utilizar la perforadora de piel, insertándola usando una combinación de movimientos de presión hacia adelante y rotatorios unidireccionales avanzando hasta la capa de grasa subcutánea. La pieza separada de la piel es entonces gentilmente levantada de una orilla usando la punta de una aguja estéril o unos forceps con dientes finos de ratón. El exceso de sangre puede ser absorbido con una gasa antes de colocar la muestra sobre un pequeño cuadro de una tarjeta delgada de cartón, la cual tiene una flecha representando la dirección del crecimiento del pelo sobre la tarjeta ayudando al patólogo durante el corte. Un minuto después, una vez que la muestra está adherida a la tarjeta, ambas serán colocadas en un contenedor y fijadas. La herida

de la piel será cerrada en forma rutinaria y el sitio puede ser limpiado. Siempre que sea posible, deberán realizarse biopsias representativas del espectro de las lesiones de la piel, en el caso de pequeñas pápulas, pústulas y nódulos las lesiones serán extirpadas en su totalidad <sup>70</sup>.

**Biopsia elíptica:**

Particularmente usada para el muestreo de lesiones ulceradas, la biopsia elíptica permite al patólogo alinear al espécimen sobre su eje longitudinal para seccionarlo, resultando que la zona de unión entre la piel ulcerada y no ulcerada no se pierda durante el proceso <sup>70</sup>.

**Biopsia excisional:**

En caso de ser necesario retirar una masa completa epidermal o termal, se realizará, una biopsia excisional en la cual el margen periférico del tejido sano sería incluido <sup>70</sup>.

**b) Como se conserva**

Las muestras deben ser fijadas con al menos 10 veces más de su volumen con solución de buffer fosfato de formalina al 10%.

Si la muestra es mayor de 2 cm, es necesario realizarle cortes en intervalos de 1 cm, para permitir la penetración adecuada de la solución de formalina al 10% <sup>70</sup>.

### **c) Información que proporciona**

Pueden confirmar en la mayoría de los casos la causa etiológica en casos de patologías de piel en general o ectoparasitaria. La muestra obtenida por biopsia sirve para el examen histopatológico <sup>70</sup>.

## **8.3. Tipos de análisis posibles a partir de muestras de pelo, piel y mucosas**

### **8.3.1. Cultivo bacteriológico**

#### **8.3.1.1 Piel**

##### **a) Como se colecta**

Si la lesión es plana, es necesario raspar la piel con una hoja de bisturí hasta lograr un sangrado de la zona. Se coloca una pequeña cantidad de muestra en un tubo o en un recipiente de análisis coprológico, asegurando que se mantenga húmedo, para lo cual pueden agregarse 2 a 3 gotas de solución salina fisiológica estéril. Es necesario realizar su transporte inmediatamente al laboratorio, manteniendo la muestra a temperatura ambiente. Si la lesión presenta una superficie sangrante, es necesario impregnar un hisopo estéril con movimientos de rotación sobre la zona raspada. Cuando la lesión es en forma de pústula o absceso, se limpia la zona. En el caso de abscesos se debe rasurar la zona para puncionar la lesión con una aguja o la punta de un bisturí y tomar el material purulento con la ayuda de un hisopo <sup>51</sup>.

Otra técnica para la recolección del material purulento de los abscesos es mediante una aguja número 16 o 18 G y una jeringa de 5 o 10 ml estéril, con los

cuales se aspira una cantidad aproximada de 5 ml. Al retirar la aguja se aplica una solución desinfectante en el lugar de punción <sup>51</sup>.

Si la lesión es una vesícula, la muestra debe tomarse siempre que sea posible de una vesícula fresca, aún no rota. La técnica de aspirado es la misma utilizada para los abscesos, con la diferencia de que en este tipo de lesiones la muestra se coloca en tubos de ensayo estériles sin solución salina. Si la vesícula se encuentra rota se debe obtener la mayor cantidad de epitelio y se depositará en frascos estériles con solución de glicerina buferada al 50% o en medio de transporte Stuart <sup>27</sup>.

También se puede mandar biopsias de piel para el cultivo bacteriológico manteniéndolas en congelación (la técnica de colección de biopsia se describe en el punto 8.2.1. pag 88)

Para el cultivo de bacterias anaerobias ( ver Anexo 12 )

## **b) Como se conserva y tiempo de envío.**

Si la muestra va a tardar más de 6 horas en llegar al laboratorio es necesario utilizar el sistema culturette para la toma y el envío de los hisopos.

La muestra de piel deberá ser enviada en frascos o tubos de ensayo estéril en un tiempo máximo de 12-24 horas. El material colectado puede ser enviado al laboratorio en un medio de transporte como el Stuart para análisis bacteriológico. Las muestras se envían frescas o en refrigeración <sup>27,32,51</sup>.

Para prevenir la desecación de las biopsias pequeñas durante el transporte, como las lesiones en la piel que son obtenidas con sacabocados, estas deben

viajar en un sistema de transporte con medio de mantenimiento (Culturette o Port – A-Cul, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.)<sup>36</sup>. También puede usarse un medio como el Amies con carbón activado en el cual la mayoría de las bacterias pueden durar hasta 15 días.

### **8.3.1.2. Mucosas**

#### **a) Como se colecta**

Las muestras se pueden obtener de la mucosa rectal, vaginal o prepucial, nasal y conjuntival por medio de un hisopo con la siguiente técnica <sup>71</sup>:

- Se utiliza un hisopo estéril, guardado dentro de un tubo cerrado con medio de transporte (medio para cultivos celulares, solución de Hanks, PBS, o solución salina isotónica).
- Se toma la muestra y se rompe el hisopo de tal forma que la parte de algodón (no tocada con los dedos) quede dentro del tubo que a su vez contiene medio de transporte.

#### **b) Como se conserva**

Como muchas bacterias son susceptibles a la desecación durante el envío, se sugiere que el hisopo sea colocado en un medio de transporte sin nutrientes, comercialmente están disponibles hisopos conocidos como "Culturrectes"<sup>®</sup> y otros sistemas similares que utilizan un medio de transporte (como Stuart o Amies). Todas estas muestras deben ser manejadas en refrigeración hasta su análisis

68,72

En el caso de las bacterias anaeróbicas que son sensibles al oxígeno, existen sistemas comerciales de transporte (como el Amies con carbón activado).

Algunos laboratorios de diagnóstico proveen de este tipo de medios de transporte anaeróbico, y tubos con tapón de rosca que contienen gas sin oxígeno para enviar los hisopos. También se puede enviar material líquido en una jeringa eliminando el aire y la aguja clavada en un tapón de hule para evitar el goteo <sup>68</sup>.

### **c) Información que proporciona**

Identificación de las bacterias asociadas a la muestra clínica <sup>72</sup>.

### **d) Tiempo para procesar**

Las muestras se deberán enviar lo más pronto posible al laboratorio, si esto no es posible se pueden mantener en refrigeración de 24 a 48 hrs, o bien en un hisopo con un medio de transporte y en refrigeración puede llegar a durar de 15 a 30 días (com pers MVZ María Antonieta Mojica<sup>7</sup>)

## **8.3.2. Muestras micológicas**

### **8.3.2.1. Como se colectan las muestras**

#### **a) Dermatofitos.**

El pelo depilado es la muestra mas adecuada para el aislamiento de dermatofitos, aunque se debe recordar que algunas especies que son poco comunes (ej, *Microsporum persicolor*), son encontradas solo en el estrato corneo, por lo que debe también ser colectado un raspado seco de las escamas de la piel. Con la ayuda de un bisturí se raspa en la interfase de la zona afectada y sana levantando escamas y pelos, asegurando que la muestra incluya material sano y

---

<sup>7</sup> Comunicación personal MVZ María Antonieta Mojica, Departamento de Microbiología FMVZ-UNAM, Noviembre 2004.

afectado. Cuando se toma muestra de pelo, estos deben ser depilados utilizando unas pinzas del margen de la lesión alopecica y colocándolos en un contenedor seco y estéril para transportarlo al laboratorio. Alternativamente el pelo arrancado puede ser puesto en un medio de transporte para hongos (dermatofitos) como el DTM (medio para prueba de dermatofitos)<sup>70,51,27</sup>.

El diagnóstico de micosis producidas por dermatofitos se facilita cuando las muestras colectadas (raspados de piel, escamas y pelo depilado) se depositan en medios selectivos como el medio para prueba de dermatofitos; de esta forma aumentan las posibilidades de aislamiento, en comparación con el envío de muestras secas de raspados de piel en sobres de papel o cualquier otro tipo de empaque<sup>73</sup>.

Se puede depositar una parte de la muestra en un portaobjetos y teñirla con KOH 20% para verla al microscopio y observar las esporas, micelos e hifas.

#### **b) Levaduras.**

Las infecciones de levaduras en piel y mucosas con organismos como *Malassezia* o *Candida sp*, pueden ser colectadas utilizando un hisopo humedecido y estéril, el cual es mandado al laboratorio en un medio de transporte apropiado<sup>70</sup>.

Las micosis subcutáneas o profundas son poco comunes y generalmente se presentan lesiones de papulares a nodulares, solas o múltiples, que pueden ulcerarse y estar drenando. Esas lesiones pueden ser evaluadas utilizando un hisopo del líquido drenado o por una biopsia de piel, debido a que el material colectado puede ser enviado al cultivo micológico<sup>70</sup>.

Cuando se sospecha de una micosis sistémica, se pueden enviar trozos de tejido afectado en bolsas de plástico estériles en refrigeración. También se puede mandar el exudado del área afectada en frascos estériles <sup>73</sup>.

### **8.3.2.2. Tiempo para procesar**

La muestra de las lesiones de piel puede ser enviada en frascos o tubos de ensaye estéril y debe de llegar al laboratorio en un tiempo máximo de 12 horas <sup>27</sup>.

El pelo depilado y guardado en sobres de papel o sembrado en medios especiales duran largos periodos de tiempo y los hisopos en medio de transporte pueden durar de 15 a 30 días, aunque de preferencia se debe mandar la muestra lo más pronto posible al laboratorio.

### **8.3.2.3. Información que proporciona**

El cultivo micológico sirve para la clasificación e identificación de hongos y levaduras asociados a la muestra clínica <sup>27</sup>.

## **8.3.3. Toxicología**

### **8.3.3.1. Como se colecta y conservan el pelo y la piel**

Las muestras de pelo que pueden ser cortadas a ras de la piel, deden ser conservadas en bolsas de polietileno con cierre hermético y guardado en congelación hasta que sean analizadas. Las muestras constituidas por tejidos como en el caso de la piel deben ser congeladas y envasadas en forma que lleguen al laboratorio manteniéndose congeladas <sup>18,60,74</sup>. (Ver anexo 7)

### **8.3.3.2. Tiempo para procesar las muestras**

Ambas muestras en congelación duran largos periodos de tiempo <sup>59</sup>.

### **8.3.3.3. Información que proporciona**

Sirve para estudiar el impacto de los contaminantes ambientales, como por ejemplo pesticidas clorinados <sup>62</sup>.

Los elementos que pueden ser medidos en el pelo se muestran en el Anexo 7

### **8.3.4. Análisis hormonal**

#### **8.3.4.1. Como se colecta y conserva el pelo**

Se debe depilar entre 7 y 20 mg de pelo (esto equivale a un mechón de pelo de un diámetro de 0.5 a 1 cm) por cada animal, también puede ser colectado el pelo de las madrigueras o bien usando una trampa adhesiva para pelo, ya que no hay variación de los resultados hormonales si se realizan los análisis de la raíz, la punta o de la parte media del pelo <sup>75,76</sup>.

El pelo colectado se coloca en bolsas de plástico limpias para enviarlas al laboratorio o se lavan con agua corriente, se secan al aire y se reempacan en una bolsa de plástico limpia y se almacenan a temperatura ambiente hasta su análisis <sup>77</sup>.

#### **8.3.4.2. Tiempo para procesar**

Largos periodos de tiempo

### 8.3.4.3. Información que proporciona

El análisis de pelo permite monitorear los cambios hormonales a largo plazo (semanas o meses). Sin embargo no es adecuado para el monitoreo a corto tiempo (horas, días) <sup>75</sup>.

El pelo ha sido usado para medir progesterona, estradiol, testosterona, corticosteroides, glucocorticoides y cortisol en diferentes especies (vacas, humanos, daman de El Cabo (*Procavia capensis*) <sup>75,76,77</sup>.

### 8.3.5. Análisis genético

El método más exacto y confiable para la identificación individual es la tipificación de su ADN. La eficacia y confiabilidad de este tipo de pruebas se encuentra cercano al 100%. No existe la posibilidad que dos animales tengan el mismo perfil de ADN a excepción de los gemelos univitelinos. Tampoco existe la posibilidad de que el ADN pueda variar con el tiempo o ser adulterado <sup>49</sup>.

#### 8.3.5.1. Colección, almacenaje y tiempo para procesar la muestra.

##### a) Muestra de piel

La muestra se toma como cualquier biopsia de piel y para este tipo de pruebas se requiere 3-5 mm<sup>3</sup>. Se transporta y conserva en contenedores plásticos limpios a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo <sup>47</sup>.

##### b) Muestra de pelo

En los animales capturados y anestesiados las muestras se deben extraer con pinzas o con el dedo pulgar e índice tomando suavemente el pelo en la base de unión con la piel. El pelo debe ser arrancado no cortado, la raíz de l pelo debe

quedar en el extremo del mismo después de que se retira del cuerpo y no debe tocarse el extremo del pelo que estaba unido a la piel (foliculo piloso)<sup>78,49,79</sup>.

Para los animales que no pueden ser capturados se puede utilizar la técnica de Proctor (1995), que consiste en colocar un alambre que arrancará el cabello cuando el animal pase por debajo, sobre o a través de este, al tratar de alcanzar un cebo<sup>48</sup>.

Se recomienda tomar una cantidad suficiente de pelo (mínimo 6) porque no todo el pelo con bulbo es susceptible para el análisis de ADN nuclear; ya que dentro de las tres fases de crecimiento: anagénica (fase de crecimiento y elevada actividad celular), catagénica (fase de madurez con moderada actividad celular) y telogénica (fase terminal sin actividad celular), esta última no sirve porque no tiene un núcleo celular activo<sup>80</sup>.

Una vez obtenida la muestra esta se coloca en bolsas herméticas de plástico con la fecha, lugar e identificación del animal y será almacenada a temperatura ambiente. Las muestras tomadas no caducan y sirven incluso si pasan semanas, meses o aún años<sup>78</sup>.

### **8.3.5.2. Información que proporciona**

Se utilizan los análisis de ADN para estimar tamaños, distribución y variación genética de las poblaciones, todos estos indicadores de salud poblacional. También para determinar especie, sexo e identificar individuos. Este tipo de pruebas se pueden utilizar en investigaciones que sirvan para identificar cuantos animales hay, donde están, como están: relacionados (paternidad, maternidad) y si hay poblaciones ecológicamente significativas que necesiten mayores esfuerzos de conservación<sup>48</sup>.

### **8.3.6. Inmunohistoquímica**

Las tinciones de inmunohistoquímica se basan en la detección de antígenos en células y tejidos, mediante anticuerpos específicos marcados con una enzima, que cuando se expone a un sustrato en presencia de un cromógeno el sitio de reacción antígeno- anticuerpo se puede visualizar a través del microscopio óptico<sup>81</sup>.

#### **8.3.6.1. Como se colecta y conserva**

Los tejidos se deben enviar fijados en formalina neutra buferada al 10%<sup>82</sup>.

#### **8.3.6.2. Tiempo para procesar**

Se recomienda que los tejidos fijados en formalina deben analizarse dentro de las primeras 24-48hrs. Las muestras ya incluidas en cubitos de parafina pueden durar más de 30 años<sup>82</sup>.

#### **8.3.6.3 Información que proporciona**

La inmunohistoquímica ha sido empleada para el diagnóstico e identificación de agentes infecciosos como virus, bacterias, parásitos y hongos<sup>81</sup>.

### **8.3.7 Histología o histopatología**

El estudio con microscopía de luz sigue siendo la base fundamental del diagnóstico histopatológico aplicado a la clínica, especialmente en biopsias y necropsias, donde este diagnóstico histopatológico sirve de referencia para

identificar enfermedades, evaluar pronósticos y tratamientos realizados, observar efectos de enfermedades y plantear tratamientos en específico <sup>83</sup>.

### **8.3.7.1 Como se colecta y conserva**

La muestra tomada por biopsia puede ser fijada con formalina neutra al 10% para enviarlo al laboratorio <sup>83,84</sup>.

### **8.3.7.2 Tiempo para procesar**

Las muestras fijadas con formalina neutra al 10% pueden durar largos períodos.

## **8.3.8. Microscopía electrónica**

### **8.3.8.1 Como se colecta y conserva**

Las muestras para microscopía electrónica deben fijarse en glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfato pH 7.4 que se solicita al laboratorio con las instrucciones para la toma y fijación de la muestra. Los fragmentos deben ser pequeños y tienen que fijarse en forma de varios trocitos cuboides de tejido de no más de 1 mm<sup>3</sup> de grosor, obtenidos con hoja de afeitar o bisturí limpios.

Se coloca un pedazo de tejido de 1cm<sup>3</sup> a la cual se le coloca una gota del fijador, se deja transcurrir 2 0 3 min para que tome consistencia. Luego se cortan pequeñísimos trozos de menos de 1mm<sup>3</sup> de grosor, con una navaja delgada. Con un aplicador de madera se pasan estos fragmentos a un frasco pequeño, se tapa y se rotula el frasco, anotando la hora en que se metió al fijador <sup>83,85</sup>.

### **8.3.8.2 Información que proporciona**

La mayor utilidad de la microscopía electrónica de transmisión es la oncología, particularmente en el diagnóstico de neoplasias malignas que en conjunto con la inmunohistoquímica permiten identificar un alto porcentaje de este tipo de neoplasias (95%)<sup>83</sup>. También es importante para el estudio de enfermedades del riñón. Otras aplicaciones son la identificación de partículas virales intranucleares y citoplasmáticas, también en enfermedades metabólicas ya que permiten estudiar el tipo de inclusión o cuerpos de inclusión en las células afectadas. La microscopía electrónica de barrido se utiliza en el estudio de superficies celulares, en las enfermedades del tallo piloso como por ejemplo el pelo afectado con *Microsporum*<sup>83</sup>.

### **8.3.8.3 Tiempo para procesar**

Se recomienda que los tejidos no permanezcan más de 6 horas en el fijador glutaraldehído<sup>85</sup>.

## **8.3.9. Ectoparásitos**

### **8.3.9.1. Como se colectan**

#### **8.3.9.1.1 Artrópodos**

Se colectan impregnando una torunda de algodón con alcohol – éter, pasándose sobre el animal repetidas veces, los ectoparásitos colectados (piojos, pulgas), son puestos con alcohol de 70° para su identificación en el laboratorio<sup>40</sup>.

### 8.3.9.1.2. Miasis o Gusaneras

a) *Miasis subcutánea*.- La colecta se hace por extracción manual, haciendo ligera presión de la larva del parásito sobre las heridas, hasta lograr la expulsión de los mismos. Una vez obtenidas las muestras, son lavadas con agua y conservadas en alcohol de 70°<sup>40</sup>.

b) *Miasis cavitarias*.- Las larvas se colectan haciendo lavados con solución de bicarbonato de sodio al 2% o a la necropsia. Se conservan en alcohol de 70°<sup>40</sup>.

### 8.3.9.1.3. Arácnidos

a) *Garrapatas*.- La obtención de estos parásitos se realiza por extracción manual, la cual se realiza colocando el dedo índice en la parte ventral de la garrapata y el pulgar en el dorso, accionando en el dorso como si se destapara una botella, una vez colectados, son conservados en alcohol al 70°, para su identificación en el laboratorio, o bien, en un frasco con la tapa perforada y papel filtro humedecido para mantenerlas vivas<sup>40</sup>.

b) *Ácaros productores de sarna*.- Se eligen áreas cutáneas escamosas con alopecias (desprovistas de pelo), y con la ayuda de un bisturí se hacen raspados con glicerina en el área afectada, incluyendo los bordes de la lesión arrastrando pelo y escamas. La muestra se conserva en muy poca glicerina, una cantidad pequeña de la muestra se pone en un portaobjeto y se observa al microscopio compuesto en busca de estos ácaros (ver el punto 8.1.1.)<sup>40</sup>.

Algunos ácaros se encuentran en el conducto auditivo, los cuales se colectan introduciendo un hisopo al oído impregnado en glicerina, haciendo movimientos circulares, los hisopos son colocados en bolsas de plástico para observarlos en el laboratorio<sup>40</sup>.

### **8.3.9.2. Como se conservan y envían**

Los ectoparásitos se pueden conservar con alcohol de 70° o formalina al 5% y en el caso de ácaros con glicerina en recipientes de vidrio o plástico y guardados a temperatura ambiente<sup>40,44</sup>.

### **8.3.9.3. Información que proporciona**

La colección de ectoparásitos sirve para la identificación del parásito colectado.

### **8.3.10. Examen citológico**

#### **8.3.10.1. De lesiones cutáneas y subcutáneas**

##### **a) Como se toma y conserva la muestra**

Las lesiones cutáneas son fácilmente accesibles y no hay contraindicaciones significativas en la toma de muestras<sup>86</sup>.

Dependiendo de las características de la lesión, se toma la muestra por aspiración con aguja fina (PAF), frotis, impronta y/o raspado (dichas técnicas están descritas en el capítulo 9 de citología)<sup>86</sup>.

Excepto para la citología vaginal, los hisopos para recoger muestras se utilizan únicamente cuando no se puede hacer improntas, raspados o aspirados<sup>36</sup>.

Para humedecer el hisopo se utiliza solución isotónica estéril, como el NaCl al 9%, aunque las lesiones muy húmedas no lo requieren. Humedecer el hisopo ayuda a minimizar el daño celular durante la toma de la muestra y preparación del

frotis. Después de obtener la muestra, se hace rodar el hisopo a lo largo de la superficie de un portaobjetos limpio, para después fijarse y teñirse como se menciona en el capítulo 9 de citología, pag 113 <sup>86</sup>.

### **b) Información que proporciona**

La citología ayuda a evaluar la morfología celular y a identificar procesos inflamatorios, neoplásicos o agentes infecciosos <sup>86</sup>.

### **c) Tiempo para examinar**

Las laminillas fijadas y teñidas duran largos periodos de tiempo

## **8.3.10.2. De la mucosa rectal**

### **a) Como se obtiene y conserva la muestra**

Se realiza un raspado con instrumento rígido, como una espátula de laboratorio o un raspador conjuntival o de oído. Con los hisopos de algodón normalmente, no se obtienen muestras diagnósticas porque no son suficientemente abrasivos para obtener una muestra subepitelial. Para obtener una muestra de la mucosa y no de heces adheridas, primero deben eliminarse las heces del recto. Con el dedo en un guante se guía el instrumento en el recto como si fuera un examen digital rectal. Debe evitar utilizarse un lubricante, o bien poner solo muy poca cantidad, por que se tiñe intensamente y puede ocultar las estructuras citológicas de la preparación. El instrumento se introduce cranealmente una distancia suficiente para evitar el ano y llegar al recto. El

instrumento debe pasarse varias veces a lo largo de la mucosa con un trazado firme. Se debe tener cuidado de no perforar el recto <sup>87</sup>.

El raspador se retira del recto protegiendo la superficie del instrumento con el dedo para no perder la muestra. El material se coloca en un portaobjetos y se extiende con el instrumento o se presiona suavemente con otro portaobjetos para obtener una preparación con una sola capa de células <sup>87</sup>.

Las preparaciones pueden teñirse con tinciones de uso común, como la de Wright, la de Diff-Quik o la de NAM y almacenarse a temperatura ambiente y protegidas del polvo <sup>87</sup>.

## **b) Información que proporciona**

El objetivo de los raspados de mucosa rectal es quitar el epitelio de cobertura y obtener una muestra de la lámina propia. El examen microscópico de esta muestra puede revelar un tumor infiltrativo, células inflamatorias o los agentes infecciosos responsables del proceso en el intestino grueso <sup>87</sup>.

## **c) Tiempo para examinar**

Las laminillas fijadas y teñidas duran largos periodos de tiempo

### 8.3.10.3. De secreciones auditivas

#### a) Como se colecta y conserva la muestra

Las muestras de secreciones auditivas para su evaluación citológica se recogen mejor con hisopos de algodón. Las muestras pueden tomarse pasando el hisopo a través del cono del otoscopio. Este procedimiento es efectivo en gatos grandes, en los que puede usarse un cono grande. Otro método consiste en introducir cuidadosamente el hisopo sin intermediarios para coleccionar una pequeña cantidad de cerumen o pus. Después de recoger las secreciones en el hisopo, este debe hacerse rodar sobre un portaobjetos limpio y seco. Las preparaciones frescas pueden examinarse antes de secarlas para observar la presencia de ácaros. Después de dejar secar el material al aire, se tiñe con cualquiera de las tinciones hematológicas comunes. Las muestras muy grasosas que contengan mucho cerumen necesitan ser fijadas con calor antes de fijarse al aire y de teñirse <sup>70,88</sup>.

#### b) Información que proporciona

Estas muestras sirven para la evaluación citológica de las secreciones del canal externo del oído en donde se buscan los diferentes tipos y cantidades relativas de bacterias (bacilos, cocos), levaduras (*Malassezia spp.*), hifas fúngicas (*Candida*), ácaros, neutrófilos, cerumen y células neoplásicas <sup>88</sup>.

#### c) Tiempo para examinar

Las laminillas fijadas y teñidas duran largos periodos de tiempo

## 9. CITOLOGÍA

El diagnóstico citológico se basa en la observación de las células que exfolian normalmente o que son recolectadas mediante algún procedimiento clínico. No solo tiene gran utilidad en la toma de muestras en animales vivos, sino también en las recolectadas durante las necropsias, donde las improntas pueden contribuir al diagnóstico del caso. El material obtenido permite hacer el diagnóstico de procesos inflamatorios bacterianos, virales, parásitos, micóticos, neoplasias y procesos degenerativos<sup>71</sup>.

Las técnicas usadas para la obtención y preparación de muestras citológicas varían dependiendo de la localización anatómica y de las características del tejido<sup>86</sup>.

Siempre que sea posible deben prepararse varios frotis, dejando algunos de ellos sin teñir, para eventuales tinciones especiales<sup>36</sup>.

### 9.1. Improntas

#### 9.1.1. De donde se toma la muestra

Las improntas pueden prepararse a partir de lesiones externas en animales vivos o a partir de tejidos extirpados en operaciones quirúrgicas o en necropsias<sup>86</sup>.

#### 9.1.2. Como se debe tomar la muestra

Las improntas a partir de úlceras deben realizarse antes de limpiar estas. La limpieza posterior se llevará a cabo con una esponja quirúrgica, humedecida con suero salino, tras lo cual debe practicarse una segunda impronta y/o raspado.

Es importante también obtener una muestra del tejido subyacente por aspiración con aguja fina <sup>36</sup>.

Para obtener lesiones cutáneas limpias o de tejidos extirpados en cirugía o necropsia, la sangre y el líquido tisular deben retirarse de la superficie mediante contacto con un material absorbente limpio. El exceso de sangre o fluidos puede inhibir la adherencia de las células tisulares a la superficie del cristal, con lo cual se obtiene una preparación celular pobre. Un exceso de fluidos dificulta la extensión de las células y la posibilidad que estas adquieran la forma y el tamaño que poseen en los frotis secados al aire. Así pues, hay que poner en contacto el centro de un portaobjetos limpio con la superficie ya secada del tejido del que se quiere obtener la impronta. Pese a que normalmente se hacen varias improntas en cada portaobjetos, una sola impronta en cada uno de ellos suele ser suficiente. Si es posible hay que realizar improntas en varios portaobjetos para poder practicar tinciones especiales cuando se requiera <sup>86</sup>.

En el caso específico de los linfonodos como ejemplo para realizar una impronta de un órgano <sup>89</sup>:

- Realizar un corte longitudinal de tejido fresco.
- Con unas pinzas tomar una mitad del linfonodo y presionar su cara interna sobre un portaobjetos.
- Presionar el órgano uniformemente de manera que se imprima todo sobre la laminilla.

### **9.1.3. Información que proporciona**

Con esta técnica se obtienen menos células que en un raspado y más contaminación (bacteriana y celular) que en una punción con aguja delgada. En consecuencia, las improntas de lesiones superficiales a menudo solo reflejan una

infección bacteriana secundaria y/o procesos degenerativos inducidos por inflamación <sup>86</sup>.

La forma de enviar conservar, enviar y el tiempo para su análisis se mencionan en los puntos 9.4 y 9.5.

## **9.2. Raspados**

### **9.2.1. De donde se toma la muestra**

Los frotis de raspados pueden prepararse a partir de tejidos obtenidos en necropsia o cirugía, o bien en lesiones externas de animales vivos. La principal ventaja del raspado es que con el se obtienen muchas células del tejido, por lo cual es recomendable practicarlo en heridas que por sus características proporcionen pocas células. Sus principales desventajas consisten en la dificultad de obtención y en que las muestras solo son superficiales <sup>86</sup>.

### **9.2.2. Como se debe tomar la muestra**

Los raspados se realizan sosteniendo una hoja de bisturí perpendicularmente a la superficie limpia y seca de la lesión, y pasando la hoja varias veces en dirección a quien realiza la operación. Un segundo raspado es el que se utiliza ya que este es el más útil. El material recogido en la hoja se deposita en el centro de un portaobjetos y se extiende con una o más de las técnicas que se describen para la preparación de frotis a partir de aspiraciones de masas sólidas (ver punto 9.3.3.)<sup>71,86</sup>.

Los métodos de conservación y envío de las laminillas se mencionan en el punto 9.4. y 9.5.

### **9.3. Punción con aguja delgada (PAD)**

#### **9.3.1. De donde se toma la muestra**

La punción con aguja delgada (PAD) es el método preferido para obtener muestras de masas palpables superficiales o lesiones localizadas en órganos internos con ayuda de ultrasonido, rayos x, fluoroscopia, gammagrafía y tomografía computada, para llegar al diagnóstico preciso de la lesión. La PAD evita la contaminación superficial que puede darse en raspados o improntas y permite recoger células de diversas áreas dentro de la lesión, lo cual ayuda a obtener material representativo <sup>36, 73</sup>.

#### **9.3.2. Como se toma la muestra**

La PAD puede realizarse usando tanto la técnica de aspiración como la técnica sin aspiración. El método usado depende del tipo de lesión, de la preferencia y la experiencia del veterinario. La técnica sin aspiración permite un mejor control de la punta de la aguja y es útil en muchas lesiones, sobre todo en punciones de lesiones profundas guiadas por ultrasonidos. Dicha técnica también se utiliza en lesiones o con órganos altamente vascularizados, al obtener células limitando la contaminación con sangre <sup>36</sup>.

##### **9.3.2.1. Selección de la jeringa y la aguja**

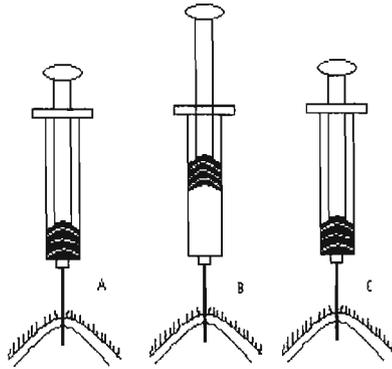
La PAD se obtiene con agujas de calibre 21 a 25 Ga y con jeringas de 10 a 20 ml. Cuanto más blando sea el tejido a aspirar, menor será la jeringa y la aguja usada. Dado que para muchas masas es difícil saber a priori el tamaño ideal de jeringa, se considera correcto utilizar la de 10 ml <sup>36</sup>.

### **9.3.2.2. Preparación de la zona**

Si se quieren hacer pruebas microbiológicas en una parte de la muestra recogida o se va a perforar una cavidad (cavidad torácica o peritoneal, articulaciones, etc), se realizará una preparación de la zona, lavando y desinfectando la piel. En los casos restantes, la preparación de la piel es básicamente solo utilizando un algodón humedecido en alcohol para limpiar el área <sup>36</sup>.

### **9.3.2.3. Técnica de aspiración: (Figura. 11)**

Se debe sujetar fuertemente la masa para facilitar la penetración de la piel y el nódulo y controlar la dirección de la aguja. Se introduce la aguja, acoplada a la jeringa, en el centro de la masa y se aplica una fuerte presión negativa tirando del émbolo hasta las tres cuartas partes del volumen de la jeringa. Realizar ligeros movimientos, adelante-atrás en la misma dirección donde se introdujo la aguja. Nunca modificar la dirección de la aguja, ya que se puede producir un daño innecesario en la zona. Se deben obtener muestras de varias áreas de la masa, pero evitando aspirar contenido hacia el cuerpo de la jeringa o contaminar la muestra al aspirar tejido que envuelve la masa <sup>36</sup>.



**Figura N° 11.**

Aspiración con aguja fina de una masa sólida. Una vez que la aguja está dentro de la masa (A), se establece presión negativa en la jeringa tirando rápidamente del émbolo (B), normalmente hasta la mitad o las tres cuartas partes del volumen de la jeringa, se redirige varias veces la aguja mientras se mantiene presión negativa, siempre y cuando la operación pueda realizarse sin que la punta de la aguja abandone la masa.

Antes de extraer la aguja de la masa, debe soltarse el émbolo y eliminar la presión negativa de la jeringa (C). (Tomada y modificada de Tyler RD et al, 1999<sup>a</sup>)

Tras obtener muestras de varias áreas, se elimina paulatinamente la presión negativa en la jeringa y se extrae la aguja de la masa y de la piel. Seguidamente se desacopla de la jeringa y esta se llena de aire. A continuación se acopla la aguja de nuevo y se presiona el émbolo rápidamente para expeler el tejido acumulado en la aguja y recogerlo en el centro de un portaobjetos. El material aspirado debe expelerse en una única gota manteniendo la punta de la aguja cerca del portaobjetos. Es esencial distribuir las células en una monocapa por medio de una de las técnicas descritas más adelante en este capítulo. Con frecuencia, el material no será visible en la jeringa y a veces ni en el cono de la aguja. Cuando sea posible deben prepararse varios portaobjetos <sup>36,89</sup>.

#### 9.3.2.4. Técnica sin aspiración

Esta técnica es útil para muchas masas, sobre todo en tejidos muy vascularizados.

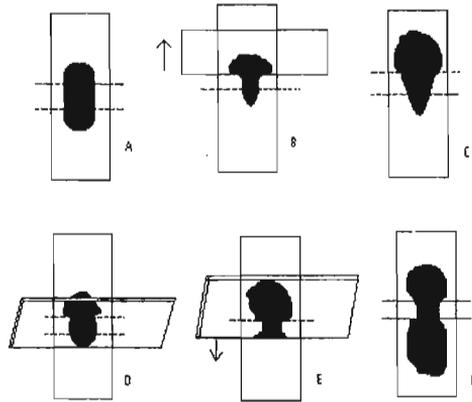
El procedimiento consiste en colocar una aguja de calibre pequeño (22, aproximadamente) en una jeringa de 10cc. Se aspira con la jeringa una pequeña porción de aire antes de la obtención del material (para permitir expulsar rápidamente el material en el portaobjetos). Se sostiene la jeringa cerca del cono de la aguja entre el pulgar y el índice para conseguir un máximo control. La masa que se desea aspirar debe ser estabilizada con la mano libre mientras se introduce la aguja. La persona que manipula la aguja debe moverla rápidamente hacia adelante y hacia atrás en un movimiento punzante, tratando de mantener la misma trayectoria. Dicho movimiento permite recoger células mediante corte y presión sobre el tejido. Hay que tener cuidado de que la punta de la aguja se mantenga en el interior de la masa, para evitar contaminar la muestra con tejido periférico. Se extrae la aguja y se expulsa el material que contiene sobre el portaobjetos limpio, dicho material se extiende mediante una de las técnicas descritas en el punto 9.3.3. El aire contenido en la jeringa permite ahorrar tiempo y la muestra puede extenderse más rápidamente, evitando que se sequen las células recogidas. Generalmente se recoge material para una sola preparación. Si es posible, deben recogerse muestras de varias partes de la masa, para aumentar la posibilidad de obtener material diagnóstico y asegurar así una toma de muestras representativa de la lesión <sup>36</sup>.

### **9.3.3. Preparación de extensiones a partir de aspirados de masas sólidas**

#### **9.3.3.1 Técnica combinada (Figura.12)**

Se expelle el aspirado en el centro de un portaobjetos sobre una superficie sólida, plana y horizontal. Se desliza un segundo portaobjetos, en un ángulo de 45 grados respecto al primero, hasta que contacte con un tercio del aspirado. A continuación se desliza rápida y suavemente el segundo portaobjetos hacia delante, como en un frotis sanguíneo. Sobre el tercio opuesto del aspirado se coloca, horizontalmente, otro portaobjetos de modo que forme un ángulo recto con el primero. Debe permitirse que el propio peso del portaobjetos extienda la muestra, resistiendo a la tentación de comprimir los portaobjetos manualmente. Manteniéndolo horizontal, se desplaza rápida y suavemente a lo largo del primer portaobjetos <sup>86</sup>.

Así se obtiene una preparación por aplastamiento en este tercio del aspirado. El tercio central debe permanecer intacto. Mediante este procedimiento el primer tercio queda extendido suavemente. Si el aspirado procede de un tejido frágil, esta área contendrá suficientes células sin romper. El último tercio habrá sido extendido con la fuerza de una preparación por aplastamiento. Si el aspirado contiene agrupamientos de células difíciles de extender, aquí habrá suficientes células separadas. Si el aspirado tiene muy poca concentración celular, la parte central será la más adecuada para examinar, debido a su mayor concentración <sup>86</sup>.



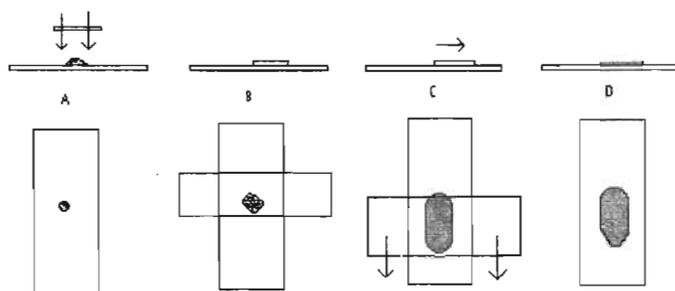
**Figura N° 12**

Preparación citológica combinada. **A.** Se expulsa una porción del aspirado sobre un portaobjetos. **B.** Se sitúa otro portaobjetos sobre un tercio de la muestra. Si es necesario extender más el material, puede aplicarse una suave presión digital. Debe evitarse una presión excesiva. Se desliza el segundo portaobjetos a lo largo del primero. **C.** De éste modo se obtiene una extensión por aplastamiento de un tercio del aspirado (área 1). El segundo portaobjetos también contiene una extensión por aplastamiento (no dibujada). Se desliza hacia la muestra el borde de un tercer portaobjetos inclinado, hasta que contacta con el tercio opuesto al aplastamiento (**D,E**). Después el segundo portaobjetos se desliza rápida y suavemente en la dirección contraria. **F.** El área obtenida (3), ha sido extendida con fuerza mecánica como en un frotis sanguíneo. El área central (2), que contiene una alta concentración de células, se deja intacta. (tomada y modificada de Tyler RD et al, 1999<sup>a</sup>)

### 9.3.3.2. Técnica de aplastamiento (Figura. 13)

Una preparación por aplastamiento se realiza expulsiendo el aspirado sobre un portaobjetos y colocando un segundo portaobjetos encima, horizontalmente, de modo que forme ángulos rectos con el primero. A continuación se desliza el segundo portaobjetos rápida y suavemente a lo largo del primero <sup>86</sup>.

Es importante no ejercer presión sobre el segundo portaobjetos durante la extensión, ya que suele provocar ruptura celular. Si quedan algunos fragmentos de tejido que no se disgregan al aplicar el segundo portaobjetos (médula espinal, p.ej.), se puede ejercer una leve presión sobre ellos con un dedo antes de deslizar el portaobjetos <sup>86</sup>.



**Figura N° 13**

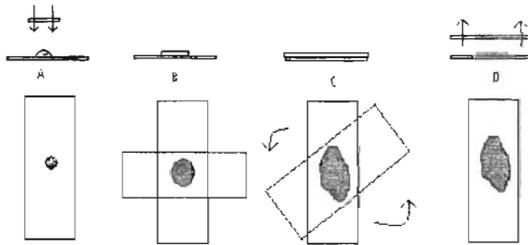
Preparación por aplastamiento. **A.** Se expele una porción del aspirado en un portaobjetos y se coloca otro encima. **B.** De este modo se extiende la muestra. Si el material no se extiende bien, se puede aplicar una ligera presión digital sobre el segundo portaobjetos. Debe tenerse cuidado en no ejercer una presión excesiva que provocaría daño celular. **C.** El portaobjetos se desliza suavemente. **D.** Se suelen obtener preparaciones bien extendidas pero también existe el peligro de causar una rotura celular excesiva. (tomada y modificad de Tyler RD et al, 1999<sup>o</sup>)

### 9.3.3.3. Técnica del frotis sanguíneo

A menudo el material que se obtiene de una Punción con aguja delgada de una lesión sólida es un material semisólido o solución de células en un fluido o en sangre. En estos casos se puede usar la técnica de frotis sanguíneo para hacer preparaciones. Dicha técnica ha sido descrita en el punto 5.4.1.5.1.pag 32 <sup>86</sup>.

### 9.3.3.4. Otras técnicas de extensión

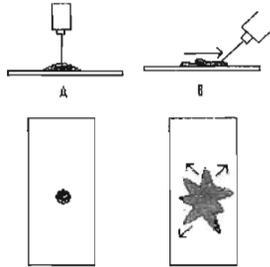
Existe una modificación de la preparación por aplastamiento que tiene menos tendencia a la ruptura celular. Consiste en colocar el segundo portaobjetos sobre el aspirado, rotarlo 45 grados y separarlo (Figura. 14) <sup>86</sup>.



**Figura N° 14**

Una modificación de la preparación por aplastamiento. **A.** Se expelle una porción del aspirado en un portaobjetos y se cubre con un segundo portaobjetos. **B.** Dicha operación provoca la expansión de la muestra. Si es necesario, se puede ejercer una ligera presión digital sobre el portaobjetos para extender un poco más la muestra, aunque debe hacerse con cuidado para no causar daño celular. **C.** El portaobjetos superior se rota 45° y se levanta, con lo que se obtiene una preparación con cresta y valles de células (**D**). (tomada y modificada de Tyler RD et al, 1999a)

Otra técnica para extender aspirados es arrastrar radialmente el material con la punta de la aguja, obteniendo una forma de estrella de mar. Por lo general, dicha técnica no daña las células frágiles, pero suele dejar una gruesa capa de fluido tisular alrededor de las células. (Figura. 15) <sup>36</sup>.



**Figura N° 15.**

Extensión con aguja o en estrella de mar. **A.** Una porción del aspirado se expelle en un portaobjetos. **B.** Se hace contactar la punta de la aguja con la gota y se mueve radialmente, arrastrando una porción de la muestra con ella. Este procedimiento se repite en varias direcciones, para obtener una preparación con múltiples proyecciones. (tomada y modificada de Tyler RD et al, 1999\*)

### 9.3.4. Preparaciones de extensiones a partir de fluidos

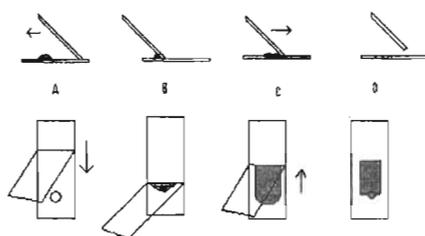
La preparación debe hacerse inmediatamente después de la toma de muestras por ejemplo en líquido torácico o abdominal. Cuando sea posible, las muestras deben tomarse en tubos preparados con (EDTA). La preparación puede hacerse directamente a partir de fluido fresco bien mezclado o a partir de un sedimento o de la centrifugación de una muestra de sangre, o con técnicas de frotis en línea o de preparación por aplastamiento <sup>86</sup>.

La técnica de frotis en línea puede usarse para concentrar fluidos de baja concentración celular, pero si se trata de un fluido con muchas células no las extenderá suficiente. En general los fluidos translúcidos tienen una concentración baja o moderada, mientras que los opacos suelen tenerla alta. Así pues los fluidos translúcidos suelen requerir una técnica de concentración, ya sea por centrifugación o por frotis en línea <sup>36</sup>.

Para concentrar fluidos por centrifugación, estos deben centrifugarse durante 5 minutos a 165-360 G. Después de la centrifugación, se separa el líquido del sedimento y se analiza la concentración total de proteínas. El sedimento se mezcla de nuevo con unas gotas del líquido separado golpeando suavemente el tubo. Se coloca en un portaobjetos una gota de sedimento de nuevo en suspensión y se practica una extensión mediante la técnica del frotis sanguíneo o la de aplastamiento. Si es posible, deben prepararse varias muestras con cada técnica <sup>36</sup>.

### 9.3.4.1. Técnica de frotis en línea (Figura N.16)

Se sitúa una gota del fluido en un portaobjetos limpio y se usa la técnica del frotis sanguíneo, con la salvedad que el segundo portaobjetos se levanta cuando ha recorrido las tres cuartas partes del camino, para conseguir así una línea con una concentración celular mucho más alta que el resto de la preparación. Desgraciadamente en la línea puede quedar un exceso de fluido que impida la correcta extensión celular <sup>36</sup>. Este tipo de frotis se utiliza cuando la muestra tiene poca celularidad.



**Figura N° 16.**

Técnica de concentración por frotis en línea. **A.** Se coloca una gota de muestra cerca del borde de un portaobjetos, se desliza un segundo portaobjetos hasta que contacta con la muestra gota. **B.** La gota se extiende entre los dos portaobjetos. **C.** A continuación se desliza rápida y suavemente el segundo portaobjetos. **D.** Cuando ha recorrido las tres cuartas partes de la distancia requerida para efectuar una extensión en la que la muestra desaparezca gradualmente, se levanta el segundo portaobjetos. Así se consigue una extensión con una línea de células concentradas en el extremo, en lugar de un borde gradual. (tomada y modificada de Tyler RD et al, 1999<sup>o</sup>)

## 9.4. Fijación de las muestras

Esta se realiza inmediatamente después de realizado el frotis, independientemente de la técnica de toma de muestra que se haya empleado <sup>89</sup>:

- Fijación húmeda. Sumergir los portaobjetos con la muestra en alcohol etílico al 70% o alcohol metílico.
- Fijación seca. Secar al aire los especímenes, agitando vigorosamente los portaobjetos, hasta ver el material seco. También se puede usar secadora de pelo con aire frío.
- Citospray. Se aplica colocando los portaobjetos en una superficie plana dirigiendo el aerosol en un ángulo de 45° y a 20 cm de distancia.

Las muestras fijadas o teñidas y conservadas a temperatura ambiente duran largos períodos de tiempo <sup>36</sup>.

## 9.5. Envío de preparaciones de muestras citológicas para su interpretación

Si es posible debe contactarse con el profesional a quien se envía la preparación citológica para establecer el manejo de las muestras, el número de preparaciones a enviar, si hay que fijar o teñir las muestras antes de enviarlas, etc. La siguiente exposición da algunas ideas generales para el envío de preparaciones para interpretación <sup>36</sup>.

Las muestras deben ir correctamente fijadas, incluir una historia clínica detallada con los datos del animal <sup>36,89</sup>.

Cuando sea posible se deben enviar 2-3 muestras secadas al aire y sin fijar, y 2-3 muestras secadas al aire y teñidas con un método tipo Romanowsky (Diff-Quik, Wright, Giemsa) <sup>36</sup>.

Algunos tejidos se tiñen mal, cuando han pasado varios días de su secado al aire. Además, los portaobjetos pueden romperse durante el transporte y ello impide su tinción al recibo de los mismos. A veces, el examen microscópico de los fragmentos de portaobjetos previamente teñidos permite obtener un diagnóstico. Si solo pueden prepararse un par de extensiones a partir de la muestra, una deberá enviarse secada al aire y sin fijar, y la otra secada al aire y teñida. Las muestras deben estar bien etiquetadas con un rotulador de tinta resistente al alcohol o algún otro método de etiquetado permanente, como el uso del lápiz diamante <sup>36</sup>.

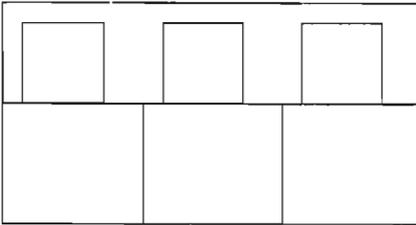
Las preparaciones de muestras fluidas deben hacerse inmediatamente. Deben enviarse preparaciones directas y preparaciones realizadas a partir de concentraciones. También debe enviarse muestras líquidas en un tubo con EDTA y un tubo de suero estéril (tapón rojo). En las muestras con EDTA podrá hacerse un recuento total de células nucleadas, una concentración de proteínas totales y si es necesario, podrán hacerse análisis químicos con la muestra en suero <sup>36</sup>.

Para el envío de las muestras se deben emplear empaques impermeables y resistentes al transporte. El tipo de empaque será de acuerdo a la forma de transportación de la muestra al laboratorio de diagnóstico, como se mencionan a continuación <sup>89</sup>:

- Envoltura en hoja de papel seco y limpio. Una vez que las laminillas están secas se envuelven de una a una, de manera que no queden pegadas entre sí.
- Cartera con tarjetas de ficha bibliográfica. Engrapando las fichas como se indica en el diagrama. (Figura. 17)
- Contenedores de laminillas. Estos se venden con los distribuidores de material médico.
- Frasco de vidrio o plástico con alcohol al 70%.

Las preparaciones deben enviarse bien protegidas. Los sobres deben ser bien acolchados, al no proporcionar los sobres corrientes suficiente protección para prevenir la rotura de los portaobjetos, el marcar los envoltorios con los avisos: "Fragil", "Rompihle" y "Por favor manejar con cuidado" suele tener poco éxito, lo efectivo es acolchar con papel de burbujas (porexpán) ambos lados del portaobjetos. Además, los portaobjetos pueden enviarse en cajas de plástico especiales o en pequeños frascos de píldoras <sup>36</sup>.

Los portaobjetos no deben enviarse con muestras que contengan formalina y deben protegerse contra la humedad. Los vapores de formalina alteran las características de la tinción y el agua provoca lisis celular <sup>36</sup>.



**Figura N° 17:** forma de transportar las muestras en portaobjetos (tomada y modificada de Candanosu E, 2004b)

## **10. Aparato reproductor**

### **10.1. Citología vaginal**

La citología vaginal exfoliativa en los felinos no se emplea rutinariamente debido a que no hay un patrón preciso para su interpretación. Esta especie es de ovulación inducida y se menciona que para provocar la ovulación se requieren varias estimulaciones de la vagina o del cuello uterino con el hisopo en intervalos de 5 a 20 min. En algunos casos esto también puede suceder al momento de introducir el hisopo para tomar la muestra para su estudio citológico<sup>90</sup>.

#### **10.1.1 Como se colecta y se conserva la muestra**

Se separan los labios vulvares y se introduce en el vestíbulo vaginal un hisopo de algodón pequeño (por ejemplo, un hisopo uretral de uso humano) humedecido con solución salina y se dirige hacia la bóveda vaginal a lo largo de la superficie dorsal del tracto. Se gira suavemente el hisopo contra la mucosa en ambas direcciones de la vagina y se retira con delicadeza. Sobre un portaobjetos, limpio y desengrasado, se rota 2 o 3 veces el hisopo y se deja secar el material al aire. Luego se procede a teñirla para su observación, pudiéndose emplear para tal fin, tinciones como Wright, Wright-Giemsa, Diff-Quik, Shorr, Nuevo Azul de Metileno, azul de metileno o solamente fijarlo en alcohol etílico (70 %) o metílico, para enviarlo así al laboratorio donde será teñido y analizado<sup>89,91</sup>.

El hisopo también puede ser usado para cultivo bacteriológico como esta descrito en el punto 8.3.1.2.

### **10.1.2. Información que proporciona la citología vaginal**

La citología vaginal sirve para obtener células epiteliales de la mucosa de la vagina, las cuales permiten identificar la etapa del ciclo estral en que se encuentra la hembra; por ejemplo, para confirmar el estro, se debe observar que más del 80% de las células vaginales están cornificadas y el fondo es limpio<sup>91,90</sup>.

El hisopo para cultivo bacteriológico sirve para la identificación de bacterias de la vagina y para el diagnóstico de infecciones reproductivas (vaginitis, metritis, piómetra)<sup>72</sup>.

## **10.2 Semen**

### **10.2.1. Como se colecta**

Una vez anestesiado el animal, se realizará un examen físico de los genitales observando el tamaño de las espículas peneanas y la apariencia anatómica del pene, midiendo también la consistencia de los testículos con base a la siguiente escala: 1 es duro, 2 es normal y 3 es flácido, también su tamaño (largo y ancho) con un caliper graduado. Con esas medidas se calculará el volumen testicular  $((\text{largo} \times \text{ancho}^2) \times 0.524)$ <sup>45</sup>.

#### **10.2.1.1 Electroeyaculación**

El semen será colectado por electroeyaculación con un electroeyaculador portátil (que tenga un voltímetro manual de 0 a 12 voltios) por ser el método más recomendado para especies silvestres potencialmente agresivas, ya que al estar anestesiado el animal no presenta ningún riesgo para el manipulador y el animal. El semen será colectado en una copa estéril de plástico tibia (puede ser entibiado

en el bolsillo del pantalón). Se utilizará una sonda rectal de estimulación de un diámetro semejante al grosor del excremento del animal, con 3 electrodos verticales que van dirigidos ventralmente a la pared del recto. La sonda será lubricada con gel (gel en base agua) para obtener el máximo contacto con la pared del recto y sea más fácil la introducción por el ano<sup>92,93</sup>. El proceso consiste en 3 series con un máximo de 80 estimulaciones (el voltaje de cada serie depende de la especie como se observa en la tabla 1<sup>94</sup> se aplican diez estímulos de cada voltaje con una duración de 1 a 2 segundos, y una vez terminada la estimulación con un voltaje se descansa 15 a 30 segundos, antes de seguir con el siguiente nivel de estimulación; terminada la serie el aparato debe ser apagado. Entre cada serie se dejará descansar al animal durante 3 a 5 minutos<sup>92,93</sup>.

<b>Especie</b>	<b>Voltaje</b>	<b>Sonda (cm)</b>	<b>Vol eyac (ml)</b>
<i>Herpailurus yagouaroundi</i>	3 a 6	1.0	0.1 +/- 0.1
<i>Leopardus weidii</i>	2 a 5	1.0	0.2 +/- 0.1
<i>Puma concolor</i>	3 a 6	2.3	2.8 +/- 0.5
<i>Leopardus pardalis</i>	2 a 5	1.6	0.3 +/- 0.1
<i>Panthera onca</i>	3 a 6	3.0	2.7 +/- 0.6

Tabla 1 Voltajes de eletroeyaculación para diferentes especies (Tomado y modificado de Howard JG, 1986)

### 10.2.2. Procesamiento del semen

Del líquido eyaculado en la copa estéril y del remanente de la punta del pene se medirá el volumen total con una micropipeta y será transferido a un tubo eppendorf estéril tibio; 3 µl (una gota) del líquido se observarán en el microscopio

portátil de campo (a un aumento de 10x) en un portaobjeto evaluando el porcentaje de motilidad (de 0 a 100%) y la motilidad progresiva (escala de 0 a 5, donde 0 es inmóvil pero vivo, 1 es leve movimiento de lado a lado sin progreso, 2 es moderado de lado a lado con progreso ocasional, 3 es pequeña progresión, 4 es constante progresión y 5 movimiento muy rápido y progresivo. También se medirá el pH del líquido usando una pequeña gota del eyaculado sin diluir en una tira de pH <sup>95</sup>.

El resto del líquido eyaculado se debe diluir siempre y cuando haya espermatozoides en la muestra, en una proporción de 1:2 con Buffer Test de Yema de Huevo (Test Egg Yolk Buffer (TEY), Laboratory Irvine Scientific) y será almacenado en una hielera con unidades refrigerantes hasta que se termine con la sesión de electroeyaculación. Estas pruebas se realizan en todas las series, pero antes de diluir el eyaculado de las siguientes series se debe fijar una porción para el estudio de morfología. (Ugaz CM, com pers<sup>8</sup>)

Si no se cuenta con el microscopio en campo no se podrá evaluar motilidad por lo tanto solamente se diluirá el líquido eyaculado con buffer Test de yema de huevo, en la misma proporción ya mencionada y se almacenará refrigerado hasta que se evalúe en el microscopio

### **10.2.2.1. Evaluación de la morfología**

Usando 5 µl del semen sin diluir mezclado con 50 µl de glutaraldehído al 0.3% en un tubo eppendorf o criovial se fijará la muestra. El tubo debe ser identificado apropiadamente y guardado en refrigeración hasta que sea evaluado, en un microscopio de contraste de fases con un aumento de 100x y aceite de

<sup>8</sup> Com pers. MV MC Cristian Ugaz, Estudiante de doctorado Dep. Etología y Fauna silvestre FMVZ-UNAM. Oct, 2004.

inmersión, evaluando 100 espermatozoides. Varios métodos de tinción incluyen la tinción de nitrato de plata y la tinción de bengala verde/rosa han sido usadas para la evaluación de la estructura espermática en carnívoros silvestres<sup>93</sup>. Otro método para evaluar la morfología es tomando una gota de semen a la que se le agrega una gota de eosina-nigrosina y se hace un frotis, posteriormente se le pone un cubreobjetos y se observa al microscopio<sup>96</sup>. Las alteraciones morfológicas descritas en diferentes especies de felinos son macrocefalia, microcefalia, bicefalia, tricefalia, acrosoma anormal, aplasia mitocondrial, flagelo enrollado, flagelo curvo con o sin gota citoplasmática, gota citoplasmática proximal o caudal, y pieza media curva<sup>93</sup>.

Para evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se tiñe la muestra con cualquier tinción, los espermatozoides muertos se tiñen completamente y los vivos no se tiñen<sup>97</sup>.

#### **10.2.2.2. Procedimientos que se pueden realizar en la estación de campo**

Para iniciar esta etapa se debe preparar una botella de 100 ml de Ham F10<sup>9</sup> agregando una mezcla de piruvato de sodio (2.6 mg/100ml), glutamina (28.4 mg/100ml), penicilina G (5 mg/100ml) y estreptomycin (5 mg/100ml); luego se retiran 5 ml de la botella de Ham F10 con una pipeta estéril para reemplazarlos con 5 ml de suero fetal bovino, con esta preparación se realizarán algunas de las pruebas con las células sexuales (concentración, estado acrosomal, longevidad y congelación)<sup>45</sup>.

---

<sup>9</sup> Cell culture, nutrient mixture, Laboratorio Sigma-Aldrich, # N-6013.

Usando un filtro estéril se deben separar 10 ml, de la solución preparada, que serán usados en un día de trabajo. Se transferirán 3 ml de éstos a una placa de petri de 35 mm de diámetro y colocarla en una termoplatina a 37° Celsius. El resto de la botella se puede guardar refrigerada de 3 a 4 días <sup>45</sup>.

### **10.2.2.3. Concentración espermática**

La concentración se determinará combinando el semen diluido de las tres series, pero solo en aquellas muestras que tengan células espermáticas. Al llegar a la estación de campo se sacará el tubo eppendorf con los eyaculados diluidos de la hielera, se mezclará bien y en otro tubo eppendorf se colocarán 995 µl de agua y 5 µl de semen, para obtener una dilución de 1:200, se deben esperar 5 a 10 minutos para que se mueran las células. En un hemocitómetro se hará la evaluación, se deben llenar ambas cámaras y el conteo se realizará en las cuatro cámaras grandes de las esquinas (son 16 cuadros pequeños por cada uno), la cantidad de células contadas se divide entre 4 para determinar el número de espermatozoides por cada cuadro grande. Luego se multiplicará el número obtenido por 10 para determinar el número de células por µl del semen diluido y finalmente se multiplicará por 200 para corregir la dilución de 1:200. Para la conversión a millones de espermatozoides por ml, se multiplicará el número de células por µl por 1000. También se debe corregir la dilución inicial para saber la concentración de espermatozoides en el eyaculado original sin diluir, como la dilución es 1:2 se multiplicará por 3. Finalmente se multiplica la concentración del semen inicial (número obtenido anteriormente) por el volumen, para conocer la concentración total del eyaculado <sup>92,95</sup>.

#### **10.2.2.4. Longevidad o viabilidad espermáticas (para evaluación pre-congelación)**

Primeramente se deberá evaluar la motilidad (% de motilidad y motilidad progresiva) del semen diluido en TEY.

El semen diluido en TEY se debe diluir ahora en HAM F10 en una proporción de 1:1 (a temperatura ambiente) y dividir en dos partes iguales en tubos eppendorf separados, para centrifugar a 600 G por 10 minutos. Esto se hace para mejorar la calidad de la muestra ya que se elimina el plasma seminal, las bacterias y los microorganismos que contiene la muestra, aumentando la duración de la motilidad espermática (Howard, JG, 1993). Previamente, se deben preparar 5 ml de Ham F10 con 23.8 mg de Hepes<sup>10</sup>, y 8 µl de NaOH, esta mezcla se filtra (con un filtro estéril) en un tubo cónico con tapa de 15 ml<sup>45</sup>.

El sobrenadante del semen centrifugado se retira y el pellet de células de un tubo eppendorf se resuspenderá en 100 µl de Ham F10 preparado con Hepes que debe estar a temperatura ambiente. El otro tubo se debe resuspender en 100 µl de Refrigerator Medium Test<sup>11</sup>, mezclado con 400 µl de glicerol 4 % (antes se deben extraer 400 µl del Refrigerador Medium Test), estos tubos se utilizarán en la criopreservación del semen extraído.

Con el semen resuspendido en Ham F10 preparado con Hepes se determinará la concentración espermática y el porcentaje de motilidad, para luego diluir la muestra restante hasta llegar a una concentración de  $10 \times 10^6$

---

<sup>10</sup> Buffer, Laboratorio Sigma-Aldrich, # H-4034.

<sup>11</sup> Refrigeration Medium Test Yolk Buffer, Irvine Scientific # 9972.

espermatozoides móviles por ml; de esta nueva dilución se extraerán tres gotas de 25  $\mu$ l que serán colocadas en una placa petri previamente dividida en tres con un marcador por el reverso de su base para identificar los tiempos de incubación, luego las gotas se deben cubrir con aceite mineral hasta que estén completamente sumergidas, la placa petri debe ser protegida de la luz con papel aluminio para incubarlo en una termoplatina a 37°C por 6 horas. A las 0, 1, 3 y 6 horas de incubación se medirá la concentración espermática, y a las 0 y 6 horas se analizará el estado del acrosoma (de la misma manera descrita anteriormente) de los espermatozoides de la muestra que se encuentra en la placa petri <sup>45</sup>.

#### **10.2.2.5. Determinación del estado del acrosoma**

Se mezclan 3  $\mu$ l del semen diluido 1:2 en TEY, con 12  $\mu$ l de tinción Pope Stain en un tubo eppendorf y se espera por 2 minutos. Esparcir 7  $\mu$ l de la mezcla teñida en dos porta objetos marcados con la identificación del animal y se deja secar al aire. Una vez seco se ponen 5 a 10  $\mu$ l de fijador Permout en el centro del portaobjeto y se cubre con un cubreobjeto, presionando para que se peguen. Después se almacenarán en una caja hasta su evaluación, que se realizará usando un microscopio de contraste de fases, se deben estudiar 100 espermatozoides, con magnificación de 400 o 1000x. Con esta tinción se pueden observar las siguientes características de los acrosomas <sup>98</sup>:

- acrosoma intacto : se tiñen azul oscuro en la parte anterior de la cabeza.
- sin acrosoma : se tiñen rosados en la parte anterior de la cabeza.
- acrosoma parcial : partes teñidas de rosa y otras de azul en la cabeza.

### 10.2.2.6. Criopreservación de los espermatozoides

Para congelar semen de los felinos este debe tener como mínimo una motilidad de 50 %, una motilidad progresiva de 3.0 y una concentración total de espermatozoides del eyaculado inicial de 10 millones<sup>93</sup>.

El proceso de congelación se inicia diluyendo los pellets de células resuspendidas en Medium Test hasta una concentración de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml utilizando la concentración inicial de la muestra resuspendida en Ham F10 preparada con Hepes; esta concentración es necesaria por que la muestra puede llegar a bajar hasta  $20 \times 10^6$  espermatozoides/ml después de la congelación<sup>93</sup>.

Una vez obtenida la concentración necesaria, se congelarán las muestras en pajillas con vapores de nitrógeno líquido. Las pajillas que se utilizarán son de 0.25 ml y serán identificadas apropiadamente para luego ser cargadas con semen por medio de una jeringa de 1 ml, por el extremo con filtro; si el volumen de la carga es menor a 200  $\mu$ l, se deben completar con una pequeña cantidad de Refrigerator Medium Test con glicerol al 4% preparado anteriormente, dejando al inicio de la pajilla una pequeña burbuja de aire antes del semen. La punta de la pajilla deberá ser sellada con calor por medio de una pinza metálica. Una vez hecho esto se colocaran en una bolsa sellable para su refrigeración en un vaso de precipitado de 500 ml lleno de agua, que será refrigerado por 3 horas. Este procedimiento es para evitar un golpe térmico brusco provocado por la baja temperatura del nitrógeno líquido, que alteraría gravemente a los espermatozoides<sup>45, 93</sup>.

Para congelar primero se coloca una gradilla metálica, de 7 pulgadas, en una hielera que contenga 2 pulgadas de nitrógeno líquido, una vez que decrece la fase inicial de vapores se colocan las pajillas sobre la gradilla. Estas se retiran del refrigerador para colocarlas sobre la gradilla, es importante no dejarlas cambiar de

temperatura después de sacarlas del agua refrigerada, enseguida se cierra la tapa de la hielera para esperar tres minutos, luego se dejan caer las pajillas al nitrógeno líquido. Transcurrido un minuto las pajillas se colocan en un canastillo plástico pre-congelado en nitrógeno líquido y éstas en su bastón metálico debidamente marcado dentro del tanque contenedor de nitrógeno líquido. Las pajillas siempre deben estar en contacto con el nitrógeno del tanque <sup>45,93</sup>.

#### **10.2.2.7. Evaluación y descongelación de los espermatozoides**

La descongelación de las pajillas es a temperatura ambiente por 10 segundos y después se colocan en baño María a 37° C por 20 segundos más. Luego se cortarán los extremos de la pajilla para depositar el semen descongelado en un tubo eppendorf con 250 µl de Ham F10 con Hepes (a temperatura ambiente) se mezcla bien y con 3 µl se evalúa la motilidad inicial <sup>95</sup>.

El tubo eppendorf se centrifugará a 600 G por 10 minutos, luego se remueve el sobrenadante para resuspender el pellet de células espermáticas en 100 µl de Ham F10 con Hepes, como ya fue descrito <sup>95</sup>.

De la muestra se determina la concentración espermática y con ésta se diluye hasta  $10 \times 10^6$  espermatozoides móviles por ml. Luego se extraerán 25 µl (una gota) que serán depositados en una placa petri, las gotas deben ser cubiertas con aceite mineral (tibio en la termoplatina) y protegidas de la luz, para después evaluar movilidad a las 0, 1, 3 y 6 horas y el estado del acrosoma a las 0 y 6 horas<sup>95</sup>.

### 10.2.3. Tiempo para procesar la muestra

Si no se cuenta en campo con microscopio, centrifuga, hemocitómetro, tanque de nitrógeno, termoplatina y/o baño María para el análisis inmediato de la muestra, las células espermáticas morirán en el transcurso de unas horas; por lo que en el laboratorio solo podrán ser evaluadas la concentración, morfología y genética si la muestra fue diluida en TEY y conservada en refrigeración, ya que estos estudios no se verán alterados<sup>45</sup>

En el caso que se pueda congelar, las pajillas con semen pueden durar por siempre para futuros análisis e inseminación artificial <sup>45,93</sup>.

### 10.2.4. Información que proporciona

Evaluación reproductiva:

Conocer las características seminales de un macho se para conocer su capacidad reproductiva<sup>45,92</sup>.

Transferencia genética:

Por medio de la inseminación artificial se puede mejorar la propagación y mantenimiento de la diversidad genética de las poblaciones silvestres cautivas <sup>93</sup>.

Genética:

El ADN de la cabeza del espermatozoide es habitualmente la fuente más importante de ADN, 5µl de semen contienen aproximadamente la misma cantidad de ADN que 50µ de sangre. Para liberar el material genético de las cabezas de los espermatozoides se requieren métodos de extracciones especiales <sup>46</sup>.

## 11. NECROPSIA

Un estudio post mortem, por lo general, necesita de la ayuda del laboratorio para poder establecer un diagnóstico etiológico de la causa de muerte del animal. Para obtener resultados confiables es de suma importancia que tanto la toma de muestras necesarias, como su conservación se realicen de manera correcta. Con el fin de evitar pérdida de tiempo o la realización de trabajo innecesario, la persona que realice la necropsia debe saber que muestras se requieren en cada caso <sup>99</sup>.

Las enfermedades son uno de los tantos factores que afectan la viabilidad de las poblaciones silvestres. En un ecosistema en equilibrio, la mayoría de las poblaciones sobreviven con bajos niveles de enfermedad o con epizootias periódicas. Sin embargo, a medida que las poblaciones silvestres incrementan sus densidades a raíz de las restricciones de hábitat, los riesgos de presentación de una epidemia catastrófica aumentan. La transmisión de enfermedades entre los animales silvestres y domésticos también se torna más probable <sup>50</sup>.

Para determinar los riesgos que presentan las enfermedades para una población, se deben identificar las causas de morbilidad y mortalidad en esa población. La evaluación de riesgos incluye también el análisis comprensivo de la historia natural de las enfermedades infecciosas en ese ambiente, incluyendo epidemias previas. Numerosas epidemias que han afectado poblaciones importantes de animales silvestres o ganado han pasado inadvertidas debido a que no se colectaron muestras apropiadas para la realización de pruebas diagnósticas. Cuando se colectan muestras apropiadas y se toman registros escritos y fotográficos precisos, la mayoría de las causales de epidemias pueden ser determinadas <sup>50</sup>.

Mientras que lo ideal es transportar animales enfermos o recientemente muertos a un laboratorio de patología para la realización de una necropsia por personal especializado, esto no es posible en la mayoría de los casos. De todos modos, el personal de campo capacitado en procedimientos de necropsias y toma de muestras, puede coleccionar las muestras necesarias directamente. A través de este Manual se ofrecerán una serie de lineamientos prácticos para la realización de necropsias de animales silvestres y para la colecta, conservación y envío de muestras para diagnóstico<sup>50,99</sup>.

Es necesario hacer énfasis en que en cualquier necropsia se deberán tomar muestras de sangre y de diferentes órganos para poder llevar a cabo diversos exámenes. Esto se debe a que si solo se toman muestras de algunos tejidos sospechando de una enfermedad en particular y los resultados son negativos a ella o sugieren una patología diferente que requiera la evaluación de muestras de otros órganos, esto ya no sería posible y el diagnóstico quedaría incompleto<sup>50</sup>.

## **11.1 Enfermedades Zoonóticas**

Es posible que los felinos tengan una enfermedad transmisible a los humanos, como la rabia o la equinococcosis (hidatidosis) en los carnívoros que pueden producir enfermedades graves y fatales en el hombre. Es necesario que antes de realizar una necropsia, siempre se considere el riesgo potencial de estas enfermedades zoonóticas y tomar las precauciones necesarias para evitar la exposición. En campo donde en muchas ocasiones se desconocen los antecedentes del animal en el cual se hará la necropsia, se recomienda realizarla siempre como si fuera sospechosa de estas enfermedades<sup>50,85</sup>.

## 11.2. Seguridad Personal

Debido a que numerosas enfermedades de los animales silvestres pueden causar enfermedades graves y mortales en el ser humano, todos los cadáveres deben ser tratados como si contuvieran una enfermedad potencialmente peligrosa y se deben tomar medidas de protección personal. La vestimenta protectora mínima consiste en un overol, guantes y un cubrebocas que cubra la nariz y boca y botas de goma. También se recomienda el uso de un delantal plástico lavable. Además, todas las muestras deben ser manipuladas con cuidado, y las muestras no fijadas deben ser colocadas en envases herméticos para evitar el derrame de material infeccioso durante el transporte<sup>50,85</sup>.

## 11.3. Manejo de cadáveres en descomposición

La mayoría de los cadáveres se presentarán con algún grado de autólisis, pero si los tejidos se manejan en forma apropiada, las pruebas diagnósticas pueden realizarse sin problemas<sup>50</sup>.

Los tejidos para histopatología deben manipularse muy suavemente, sosteniéndolo sólo por sus bordes. Se cortan los tejidos con un cuchillo o bisturí bien afilado, colocándolos rápidamente en formol. Las muestras conservadas en formol no deben congelarse; las muestras para los análisis de enfermedades infecciosas o toxicología, deben congelarse o refrigerarse lo antes posible. La autólisis puede causar gran cantidad de artefactos o cambios en los tejidos que pueden ser confundidos con procesos infecciosos. De todas maneras, siempre es mejor tomar una muestra de un área que parezca anormal, antes que asumir que su aspecto se debe a la autólisis. El análisis histopatológico permitirá distinguir entre lesiones verdaderas y los artefactos producto de cambios post-mortem<sup>50</sup>.

## **11.4. Realización de la necropsia**

### **11.4.1. Evaluación de las características ambientales**<sup>50</sup>

Identificar las condiciones climáticas recientes que pudieran haber causado la muerte de los animales (sequía, inundaciones, tormentas eléctricas, fuertes vientos, etc.) y la temperatura ambiental existente

### **11.4.2. Determinación del estado nutricional del animal**<sup>50</sup>

- a) Tomar el peso del animal (de ser posible) y/o el largo y perímetro torácico del cadáver.
- b) Evaluar la presencia de grasa subcutánea o en las cavidades corporales.
- c) Observar la cantidad de grasa acumulada alrededor del corazón y los riñones.
- d) Clasificar la masa muscular y el estado muscular general del animal (buena o pobre)
- e) Identificar el tipo de contenido del tracto digestivo
- f) Describir el estado de la dentadura (completa, incompleta o fracturada)

Todo esto nos indica si el animal ha estado comiendo y que tipo de alimento consume.

### **11.4.3. Descripción de las anomalías halladas a la necropsia**

Cualquier anomalía encontrada debe ser descrita siguiendo el siguiente criterio: Localización, número y distribución, color, tamaño, forma, consistencia y textura. La mejor manera de documentar dichos hallazgos es tomando fotografías<sup>50,85,99</sup>

Por ejemplo: "el hígado presenta múltiples nódulos firmes, de color pardo, que varían de tamaño entre 1 y 3 cm de diámetro y se distribuyen en todos los lóbulos. Los nódulos son arenosos al corte".

#### **11.4.4. Procedimiento para la disección de un carnívoro**

##### **1. Evaluar las características externas del animal**

El cadáver debe examinarse en busca de heridas mordeduras u otros signos de predación. Si hay heridas, buscar signos de hematomas o sangrado en los tejidos cercanos a las heridas que pudieran indicar que estas ocurrieron antes de la muerte del animal. De otro modo, dichas heridas seguramente fueron causadas por los predadores. Observar el estado general del pelo. Observar si existen huesos fracturados. Buscar y conservar los parásitos externos<sup>50,99</sup>.

Antes de abrir el animal hacer una inspección externa para determinar si existen escoriaciones o tumores; también se debe observar si hay manchas en la región crural del animal que pudieran ser compatibles con diarrea. Los orificios naturales y mucosas deben ser inspeccionados para investigar la presencia de lesiones o posibles exudados. Se deben revisar los ojos y las órbitas para determinar el estado de hidratación del animal. En animales deshidratados el espacio entre el ojo y la órbita está notablemente ensanchado<sup>50,99</sup>.

##### **2. Coloque el cadáver sobre su lado izquierdo.**

Los animales se ponen generalmente en decúbito izquierdo con la cabeza al lado derecho y la cola al lado izquierdo del observador<sup>50,99</sup>.

##### **3. Corte la piel a lo largo de la línea media ventral desde el mentón hasta la cola).**

Antes del corte, en las hembras, se deben examinar las glándulas mamarias, y en los machos, el prepucio y pene. En neonatos, examinar el ombligo. Se procede a cortar la piel a lo largo de la línea media desde el hocico al pubis (ver Figura.18) hasta que queden completamente expuestas la región ventral del cuello y las cavidades abdominal y torácica. El corte de piel se continúa

hasta la parte distal de las extremidades. En este momento es recomendable examinar los nódulos linfáticos (pre-escapulares, pre-cruales, mandibulares y poplíteos), al igual que las tonsilas faríngeas y las glándulas tiroides y paratiroides. También es útil cortar con segueta la sínfisis mandibular y separar las dos ramas de la mandíbula, pues esto facilita la inspección correcta de la cavidad oral. Los dientes deben ser cuidadosamente examinados para detectar enrazaamiento irregular o maloclusión dental que pudieran estar relacionados con una pobre prensión o masticación del alimento <sup>50,99</sup>.

**4. Sobre el lado derecho del animal, quitar la piel hacia la columna vertebral.**

**5. Cortar los miembros derechos, cortando los músculos y las articulaciones de la cadera y hombro.**

**6. Abrir las cavidades abdominal, torácica y cardíaca.**

Abrir el lado derecho de la cavidad torácica cortando las costillas a lo largo del esternón y la columna vertebral (ver Figura N.18.). Abrir el saco pericárdico. La cavidad abdominal se abre haciendo una incisión en los músculos abdominales hasta que queden visibles las vísceras de esta cavidad. Hay que tener especial cuidado de no cortar el estómago o intestino en aquellos animales que tengan la cavidad abdominal distendida por gas. <sup>50,99</sup>.

Luego de abrir las cavidades (abdominal, torácica y cardíaca), se debe evaluar el estado nutricional general del animal y la ubicación de los órganos (para determinar si hay algún órgano desplazado) antes de tocar los órganos del animal. En este momento se colecta la sangre estéril para cultivo directamente del corazón del animal (lo mejor es la aurícula derecha) y luego se puede tomar una muestra mayor para pruebas serológicas. También se deben realizar los hisopos de otros órganos para cultivo bacteriológico y viral, antes de tocar los órganos internos <sup>50,99</sup>.

**7. Tomar nota y registrar la ubicación o tamaño anormal de los órganos.**

**8. Registrar la cantidad, color y contenidos de cualquier líquido que encuentre en las cavidades corporales. Buscar adherencias anormales entre órganos o con las paredes de las cavidades y determinar si son fáciles de romper.**

**9. Tomar muestras de piel, de sitios de aspecto normal y anormal.**

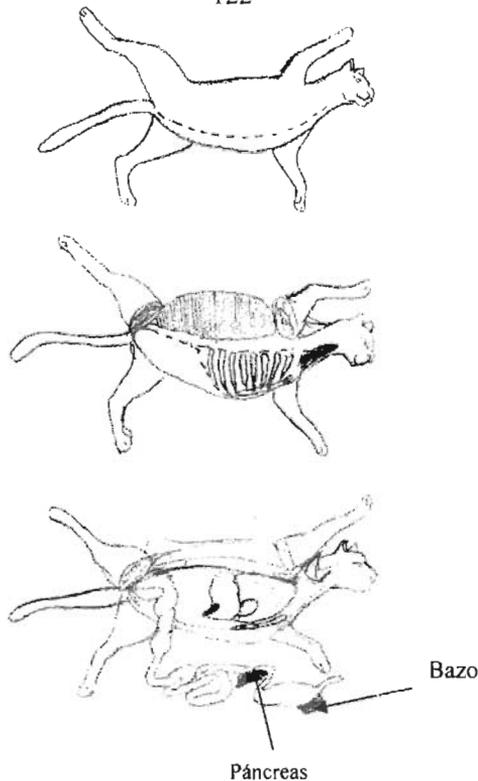
**10. Una vez abierto el cadáver se procede a examinar y toma de muestra de los órganos** <sup>50,99, 85</sup>

## **11. Procedimientos de colecta de muestras**

### **a) Estómago e intestinos**

Quitar el estómago e intestinos de la cavidad abdominal en primer lugar, pero revisarlos y cortarlos al último para evitar la contaminación del área de trabajo.

Encontrar el sitio donde el esófago se une al estómago, por medio de una atadura en el esófago se mantendrá cerrada la entrada al estómago para evitar volcar su contenido, y cortar por encima del nudo. Quitar el estómago y los intestinos como una unidad, cortando el mesenterio en sus sitios de unión con los intestinos. Tomar muestras de varios nódulos linfáticos mesentéricos. Dejar el páncreas unido a los intestinos y el bazo unido al estómago. Cortar el recto, manteniéndolo cerrado para impedir el escape de heces <sup>50,85,99</sup>. (ver Figura 18)



**Figura 18.** Cortes que se pueden realizar durante la necropsia. (tomada y modificada de Munson L, 1999)

**Paso 1:** Sitio de incisión en piel para la realización de una necropsia. Se incide la línea media en la porción dorsoproximal del cuello a la altura de la tráquea, y se extiende hasta el pubis rodeando el pene en caso del macho.

**Paso 2:** Abrir el lado derecho de la cavidad torácica cortando las costillas a lo largo del esternón y la columna vertebral, siguiendo la línea, como se muestra en la figura.

**Paso 3:** Una vez abiertas las cavidades, retirar en primer lugar el estómago e intestinos, junto con el bazo y páncreas de la cavidad abdominal, pero revisarlos y cortarlos al último para evitar la contaminación del área de trabajo, cerrando y cortando a la altura del esófago y del recto.

Abrir los intestinos en toda su extensión (lo mejor es hacerlo al final de la necropsia para evitar la contaminación de otros órganos con material alimenticio y heces). Identificar el contenido de los intestinos (cantidad de alimento, presencia de elementos extraños como plantas tóxicas, etc.). Tomar muestras de contenido estomacal para toxicología. Tomar muestras de tejido de cada porción del intestino

y del páncreas. Colectar todos los parásitos que se encuentren en el tracto digestivo y conservarlos en formol al 10% <sup>50, 85</sup>.

#### **b) Bazo, hígado, páncreas**

Separar el bazo del estómago, revisarlo en busca de anomalías, realizando cortes transversales en varios sitios. Luego tomar muestras para histopatología. Quitar el hígado y abrir la vesícula biliar. Examinar el hígado realizando cortes transversales en varios sitios. Tomar muestras para histología y toxicología <sup>50,85,99</sup>.

#### **c) Riñones y glándulas adrenales**

Quitar y examinar las glándulas adrenales situadas por delante de los riñones y tomar muestras transversales para histología. Quitar los riñones y examinarlos en busca de anomalías. Tomar muestras para histología que incluyan la corteza, médula y pelvis renal y tomar muestras para toxicología. Quitar la vejiga y tomar muestras para histopatología <sup>50, 99</sup>.

#### **d) Tracto reproductivo**

Quitar el tracto reproductivo (testículos en los machos; útero y ovarios en hembras) y hacer un corte transversal de las gónadas hacia el lumen del útero antes de colocarlos en formol para histopatología <sup>50,85</sup>.

#### **e) Corazón y pulmones**

Separar los huesos de la laringe detrás de la lengua y quitar la tráquea unida al esófago. Continuar quitando los pulmones, corazón y grandes vasos sanguíneos del tórax. Debe cuidarse de no lesionar pericardio, ni ganglios mediastinales. Tomar una muestra del timo si se encuentra presente <sup>50, 85</sup>.

Abrir, examinar y tomar una muestra de la tráquea y otras ramas del árbol bronquial y del esófago. Tomar muestras de los nódulos linfáticos que rodean el tracto respiratorio<sup>50, 85, 97</sup>.

Examinar los pulmones en busca de nódulos o áreas firmes. Una vez hecha la palpación, cortar el pulmón para investigar su apariencia interna y la presencia de posibles exudados en el parénquima. Tomar muestras de cualquier área anormal, al igual que de aquellas que parezcan normales<sup>50,99</sup>.

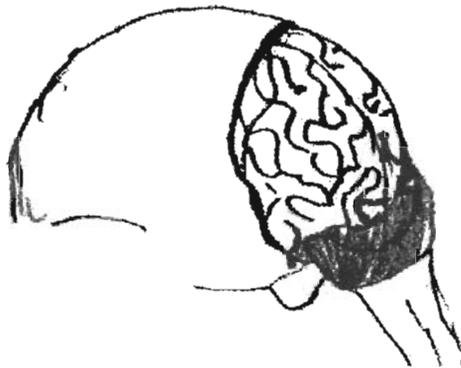
Observar la forma y el tamaño del corazón y de los grandes vasos, revisar antes de cortar el saco pericárdico si este contiene exudados o trasudados. Abrir las cavidades del corazón y examinar el estado de las válvulas cardíacas. Tomar muestras del corazón, incluyendo a las válvulas. Abrir los grandes vasos y tomar una muestra<sup>50,99</sup>.

#### **f) Cabeza y cavidad oral**

Examinar los ojos, cavidad oral y nariz en busca de úlceras o secreciones anormales. Quitar un ojo para histología, cortando los músculos que sostienen el globo ocular. Cortar entre la mandíbula y la lengua y quitar la lengua desde su base. Examinar el interior de la boca, las amígdalas y la dentadura. Quitar una amígdala y varios nódulos linfáticos debajo de la piel en el ángulo mandibular y encima de la laringe para histología. Tomar una muestra delgada de músculo de la lengua para histología<sup>50, 99</sup>.

### g) Cerebro

Para separar el cerebro entero: separar el cráneo del cuello en su unión con la primera vértebra. Quitar la piel y músculos de la cabeza y luego corte la tapa del cráneo siguiendo las marcas ilustradas en la figura. 19. Se corta desde la base de las apófisis cigomáticas hasta las apófisis supraorbitarias y se unen los dos cortes por medio de otro a través del hueso frontal<sup>50, 85</sup>.



**Figura. 19**

Obtención de muestras cerebrales en la necropsia. (Tomada y modificada de Munson L., 1999)

Quitar el cerebro completo y cortarlo por la mitad. Conservar una mitad en formol y dividir la otra mitad (longitudinalmente) en dos envases, uno para toxicología y otro para virología<sup>50, 85</sup>.

### h) Músculos esqueléticos y nervios

Las masas musculares se deben inspeccionar mediante numerosos cortes con cuchillo. Tomar muestras del diafragma y de varios músculos de los

miembros. Tomar muestras de un nervio mayor ubicado entre las masas musculares de los miembros pélvicos <sup>50, 97</sup>.

### **i) Médula ósea**

Quitar un hueso largo de un miembro y cortarlo al medio. Fijar una mitad para histología y conservar la otra mitad para microbiología. Se puede exprimir una pequeña porción de médula sobre una laminilla, se hace un frotis, se seca al aire y se fija con alcohol metílico absoluto, si no se puede procesar en seguida <sup>50,85</sup>.

### **j) Como obtener suero de un cadáver**

En animales recientemente muertos, el corazón derecho generalmente contiene coágulos de plasma (sustancia marrón amarillenta), sangre sin coagular o sangre coagulada. El plasma o la sangre deben extraerse y dejados en reposo durante unos 30 minutos aproximadamente para favorecer la formación de un coágulo. Luego pueden centrifugarse a 2000 XG durante unos 20 minutos. Las centrifugas de Mobilespin centrifuge de Vulcon Technologies (718 Main., Grandview, MO 640330 USA; 816-966-1212 o FAX 816-966-8879) son portátiles y fácilmente utilizables en el campo. Cuando no se dispone de una centrifuga, el suero puede ser obtenido dejando coagular o asentar las células sanguíneas. El suero o plasma deben ser separados de las células sanguíneas y divididos en al menos dos alícuotas. Luego se deben transferir a criotubos y mantener refrigerados o congelados a (-20 o -70°C) hasta su envío al laboratorio. Los tubos con suero deben ser rotulados con el nombre de la especie, identificación del animal, fecha y lugar de origen (ej. parque o reserva o país) utilizando un marcador indeleble <sup>50</sup>.

Si el tubo de ensayo se invierte, el contacto de la muestra sanguínea con el tapón de goma (que contiene zinc) puede contaminar la muestra y luego resultar en *falsos* valores elevados de zinc en los análisis de minerales. Si no se dispone de una centrífuga y se obtiene sangre de un animal vivo o no cuya sangre aún no se ha coagulado, colocar la sangre entera en un tubo de ensayo y dejarla coagular con el tubo invertido (tapón de goma hacia abajo). Luego se devuelve al tubo a su posición normal (tapón hacia arriba) y con mucho cuidado se quita el tapón con el coágulo adherido, dejando el suero en el tubo <sup>50</sup>.

#### **k) Como obtener muestra de orina de un cadáver**

Esta se obtiene puncionando la vejiga una vez expuesta en la cavidad pélvica, con una aguja gruesa aspirándola en una jeringa estéril. Se vacía en frascos estériles de vidrio o de plástico, lavados minuciosamente <sup>85</sup>.

#### **l) Como obtener muestras de heces de un cadáver**

Las muestras de heces se obtienen directamente del recto antes de iniciar la necropsia introduciendo una cucharilla especial para la recolección de excremento por el ano (como se describe en el capítulo de heces) <sup>32</sup>.

### **11.5. Desinfección del sitio de necropsia**

El cadáver y todos los tejidos, incluyendo la tierra mojada con sangre deben ser enterrados a una profundidad mínima de 1 metro. Una vez colocado adentro, se le cubre con desinfectante o con cal viva antes de taparlo con tierra. La incineración también se puede llevar a cabo colocando el cadáver y los residuos en el agujero, cubriéndolo todo con un material combustible como paja o ramas secas y rociándolo con petróleo para prenderle fuego. No deben quemarse al aire libre cadáveres o tejidos de animales sospechosos de ántrax ya que sus esporas

resisten altas temperaturas y pueden ser elevadas con el humo. Todo el material de plástico o papel contaminado deben ser limpiados cuidadosamente o incinerados. Se deben lavar con agua y jabón todos los elementos utilizados en la necropsia (instrumental) a fin de quitarles los residuos de sangre y tejidos. Luego, desinfectar el instrumental de manera adecuada. Las botas y delantal utilizados en la necropsia deben ser lavados a fondo, al igual que la vestimenta contaminada. Las superficies externas de los envases que contengan muestras se deben limpiar también <sup>50,85</sup>.

## **11.6. Conservación de los tejidos obtenidos de la necropsia de acuerdo a los diferentes tipos de análisis**

### **11.6.1. Análisis histológico**

#### **a) Como se conserva la muestra**

Las muestras de tejido deben tomarse de todos los órganos principales (ver anexo 10) y de cualquier área o tejido anormal (se recomienda que el grosor no sea menor de  $0.5\text{cm}^3$  ni mayor de  $2\text{cm}^3$ ) puede ser fijada con formalina neutra al 10% para enviarlo al laboratorio a temperatura ambiente. Las mejores muestras son las que incluyen una parte anormal y una normal del mismo tejido. Se pueden colocar todas las muestras en un mismo envase, si algún tejido requiere identificación especial, (por ej. un nódulo linfático determinado), se coloca en un envase diferente <sup>84,83,100,50</sup>.

#### **b) Información que proporciona y tiempo para procesar**

Ver el punto 8.3.7.

## **11.6.2. Microbiología (Bacteriología y Virología)**

### **a) Como se conserva la muestra.**

Las muestras de tejido para cultivo deben ser grandes (mínimo de 3cm<sup>2</sup>), y colectadas de manera estéril, de preferencia de zonas cercanas al borde del área afectada, de diferentes órganos (ver anexo 11). Dichas muestras deben mantenerse refrigeradas (4°C) <sup>50</sup>. En algunas ocasiones puede ser posible recuperar bacterias a partir de muestras congeladas (com.pers. Maria Antonieta Mojica<sup>12</sup>) aunque no es la forma de conservación idonea para este tipo de diagnóstico.

Las muestras también pueden tomarse con un hisopo estéril con un medio de transporte comercial<sup>50</sup>.

En el caso de pus, áreas con nódulos o abscesos, ver el capítulo de piel (punto 8.3.1.1).

Para el cultivo de bacterias anaerobias ver Anexo 12

### **b) Información que proporciona**

Identificación de bacterias o virus presentes en la muestra.

### **c) Tiempo para procesar**

Las muestras para cultivo se deben enviar lo más pronto posible al laboratorio, en refrigeración pueden durar de 24-48hrs y en congelación pueden durar de 15 a 30 días. (com pers. María Antonieta Mojica<sup>13</sup>)

---

<sup>12</sup> Comunicación personal de la MVZ María Antonieta Mojica, Departamento de Microbiología FMVZ-UNAM, Noviembre, 2004.

<sup>13</sup> Comunicación personal de la MVZ María Antonieta Mojica, Departamento de Microbiología FMVZ-UNAM, Noviembre, 2004.

### 11.6.3. Análisis Toxicológico

#### a) Como se conserva la muestra

Se toman muestras de diferentes órganos (ver anexo 11) y se coloca una mitad de cada una en papel aluminio y la otra mitad en envases o bolsas plásticas (el aluminio o el plástico interfieren con los análisis de determinadas toxinas). Las muestras deben ser conservadas en congelación hasta su envío al laboratorio (ver anexo 7) <sup>50</sup>.

#### b) Información que proporciona y tiempo para procesar

Ver punto 8.3.3.

### 11.6.4. Análisis Citológico

Para los órganos la técnica mas apropiada para tomar muestras citológicas es por improntas (ver el punto 9.1. de citología) y para masas localizadas en los órganos se recomienda la punción con aguja delgada PAD (ver punto 9.3. de citología)

### 11.6.5. Análisis Genético

- **Órganos:** Cualquier tejido del cuerpo que no se haya degradado es una fuente potencial de ADN.(University of Arizona, 1996) Las muestras de tejidos deben ser de no menor a 3 cm<sup>2</sup> y pueden ser almacenadas a -70 °C<sup>101</sup>.
- **Huesos y dientes:** Los huesos son una de las mejores fuentes de ADN a partir de restos de animales descompuestos. Incluso cuando la carne se ha

descompuesto, a menudo se puede obtener ADN del hueso desmineralizado. Las muestras de huesos se pueden guardar a temperatura ambiente sin ningún conservador <sup>46</sup>.

- **Sangre:** (ver capítulo de sangre)
- **Semen.:** (ver capítulo de aparato reproductor)

**11.6.6. Análisis de inmunohistoquímica** (ver el punto 8.3.7. del capítulo de pelo piel y mucosas).

**11.6.7. Microscopía electrónica.** (Ver el 8.3.9. del capítulo de pelo piel y mucosas).

## **12. ENVÍO DE MUESTRAS <sup>50</sup>:**

1. Contactar al laboratorio antes de enviar las muestras
2. Asegurarse de conocer las reglamentaciones vigentes para el envío de muestras. Conseguir los permisos necesarios y utilizar envases apropiados para el envío.
3. Las muestras congeladas se deben enviar en envases aislantes y por transporte expreso. Empacar las muestras con hielo seco (no se permite por vía aérea) o bloques de hielo común. Sellar bien el envase (caja) para prevenir cualquier derrame de su contenido. Incluir en el envío los permisos apropiados y la identificación de los animales remitidos.
4. Aquellos paquetes que contengan hielo seco no deben ser sellados herméticamente para permitir la evaporación del hielo seco y la eliminación de la presión que se acumule en su interior. Las muestras deben ser conservadas dentro de envases herméticos, pero el envase general (paquete) en el cual se conserven no debe ser hermético.
5. Los tejidos fijados en formol deben fijarse durante al menos una semana en envases con una proporción de 10 partes de formol contra 1 parte de

descompuesto, a menudo se puede obtener ADN del hueso desmineralizado. Las muestras de huesos se pueden guardar a temperatura ambiente sin ningún conservador<sup>46</sup>.

- **Sangre:** (ver capítulo de sangre)
- **Semen.:** (ver capítulo de aparato reproductor)

**11.6.6. Análisis de inmunohistoquímica** (ver el punto 8.3.7. del capítulo de pelo piel y mucosas).

**11.6.7. Microscopía electrónica.** (Ver el 8.3.9. del capítulo de pelo piel y mucosas).

## **12. ENVÍO DE MUESTRAS**<sup>50</sup>:

1. Contactar al laboratorio antes de enviar las muestras
2. Asegurarse de conocer las reglamentaciones vigentes para el envío de muestras. Conseguir los permisos necesarios y utilizar envases apropiados para el envío.
3. Las muestras congeladas se deben enviar en envases aislantes y por transporte expreso. Empacar las muestras con hielo seco (no se permite por vía aérea) o bloques de hielo común. Sellar bien el envase (caja) para prevenir cualquier derrame de su contenido. Incluir en el envío los permisos apropiados y la identificación de los animales remitidos.
4. Aquellos paquetes que contengan hielo seco no deben ser sellados herméticamente para permitir la evaporación del hielo seco y la eliminación de la presión que se acumule en su interior. Las muestras deben ser conservadas dentro de envases herméticos, pero el envase general (paquete) en el cual se conserven no debe ser hermético.
5. Los tejidos fijados en formol deben fijarse durante al menos una semana en envases con una proporción de 10 partes de formol contra 1 parte de

tejidos. Luego, se puede volcar la mayor parte del formol y los tejidos se pueden envolver en una tela embebida en formol para el transporte. Los tejidos así preparados pueden ser colocados en envases herméticos para su envío.

Es mejor enviar muestras congeladas y fijadas en formol por separado. Si tuvieran que viajar juntas, evitar que se congelen las muestras fijadas en formol, aislándolas con una envoltura de papel periódico. Asegurarse de que no haya pérdida de formol y contaminación de las muestras congeladas, ya que si estas se fijan con formol perderán la posibilidad de ser utilizadas para el cultivo bacteriológico o viral. También habrá alteración de las células en los extendidos de sangre o de tejidos para citología <sup>50</sup>.

### **12.1. Preparación de los envases con muestras**

Todos los envases, tubos, extendidos y bolsas deben ser identificadas usando un marcador indeleble. Para mayor seguridad se puede colocar una segunda etiqueta en una bolsa plástica y luego pegarla al envase con la muestra. Para los tejidos fijados en formol, se puede colocar una etiqueta de papel con la identificación del animal escrita en lápiz sumergida en el formol con los tejidos <sup>50</sup>.

## 12.2. Información que debe ser incluida en las etiquetas

- Fecha.
- Ubicación geográfica (nombre del parque o reserva, o nombre del pueblo más cercano, país).
- Especie.
- Sexo y edad aproximada.
- Identificación del tejido (esto no es necesario para los tejidos fijados en formol).
- Persona que tomó las muestras.
- Mencionar el conservador empleado.
- Identificación del animal (si la tuviera) <sup>50</sup>.

**13. CUADRO RESUMEN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE ANÁLISIS**

<b>MUESTRA</b>	<b>COMO SE COLECTA</b>	<b>COMO SE CONSERVA</b>	<b>TIEMPO PARA PROCESAR</b>	<b>INFORMACIÓN QUE PROPORCIONA</b>
<b>HEMOGRAMA</b>				
Sangre	En tubos de ensaye limpios, secos y con anticoagulante EDTA.	En refrigeración.	24-48 hrs. Se recomienda realizar algunas pruebas en campo.	Evaluar el estado general de salud del animal.
<b>BIOQUIMICA SANGUÍNEA</b>				
Suero o plasma	- En tubos de ensaye de vidrio, secos, limpios sin anticoagulante para centrifugar la muestra y obtener el suero.  - Tubos con gel acelerador de la coagulación.	- Refrigeración.  - Congelación.	- 4 días  - Meses o indefinidamente	La concentración de varias sustancias químicas y enzimáticas que ese encuentran en la sangre
<b>URIANÁLISIS</b>				
Orina	Cualquier método mencionado, en frascos de plástico. La mitad de la muestra en congelación y la otra en formalina o formol amortiguado al 40 %	- Congelación.  - Formol al 40 % a temperatura ambiente.	- Indefinidamente	Información sobre el tracto urinario del animal
<b>HÁBITOS ALIMENTICIOS</b>				
Heces	Directo del suelo	Se mantiene la muestra en refrigeración hasta su pronto análisis.		Componentes de la dieta y ecología trófica de los felinos.
<b>EVALUACIÓN NUTRICIONAL</b>				
Sangre	- En tubos con EDTA.	- Congelación.	- Años	- Concentración de ácido grasos en sangre.
Suero	- En tubos con gel acelerador de la coagulación - En tubos sin anticoagulante.	- Congelación.	- Años	- Concentración de Vitaminas y Minerales circulantes en sangre.

<b>EVALUACIÓN REPRODUCTIVA DEL MACHO</b>				
Semen	Electroeyaculación, en frascos de plástico de 3 a 5 ml.	Congelación en nitrógeno líquido.	Indefinidamente	- Evaluación del estado reproductivo del animal. - Congelación de semen.
<b>ANÁLISIS HORMONAL</b>				
Heces	- Se colectan en bolsas de plásticos o frascos de plásticos.	- Congelación (- 20 °C).  - Suficiente etanol a 95 % para mantener la muestra en inmersión y almacenada a temperatura ambiente (22 °C promedio).	-Tiempo indefinido.	Cuantificar las concentraciones de las hormonas esteroidales acumuladas durante el día.
Suero	- En tubos sin anticoagulantes para después obtener el suero, por centrifugación. - En tubos con gel acelerador de coagulación.	- En congelación (-15 a -20 °C).	-Meses o indefinidamente.	- Cuantificar las concentraciones de hormonas esteroidales en sangre.
Pelo	- Depilación del pelo. - Colección directamente de las madrigueras. - Trampa de cinta adhesiva para pelo.	- Después de obtener la muestra se guardan en bolsas de plástico limpias, luego se lava con agua dejando secar al aire para reempacar en bolsas de plástico limpias, a temperatura ambiente.	-Indefinidamente.	- Cuantificar la cantidad de hormonas esteroidales concentradas en el pelo.

ANÁLISIS GENÉTICO				
Sangre	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Filtro: colocar las gotas de sangre sobre un filtro grueso comercial tipo Whatman, hasta formar manchas de 1 a 2 cm de diámetro.</li> <li>- En tubos con EDTA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Una vez secas las muestras a temperatura ambiente, se conserva en bolsas plásticas autosellables en ambiente seco.</li> <li>- Refrigeración (4 °C)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Análisis de ARN y ADN viral, bacteriano o hemoparasitológico, también para la detección de anticuerpos contra algunos patógenos.</li> </ul>
Heces	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Directamente del suelo</li> <li>- Desde el recto con cucharilla</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Después de ser secadas al sol y tamizadas, el polvo se conserva en bolsas nuevas autosellables en un lugar seco y oscuro.</li> <li>- Heces en frascos con alcohol al 70 o al 95 %, a temperatura ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tiempo de duración del trabajo de campo.</li> <li>- Si es en un cuarto con aire acondicionado, un año o más.</li> </ul>	
Piel	Tomar la muestra por biopsia (3 a 5 mm <sup>3</sup> ).	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En contenedores de plástico limpios, a temperatura ambiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Largos periodos de tiempo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extracción de ADN, con lo que se identifican individualmente los felinos, identificación del sexo, la especie, etc.</li> </ul>
Pelo	Deben ser arrancados (se necesita el folículo piloso) o bien por la técnica de Proctor <sup>48</sup> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En bolsas de plástico herméticas a temperatura ambiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Largos periodos de tiempo.</li> </ul>	
Semen	Electroyaculación, en frascos plásticos de 3 a 5 ml.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diluido en TEY en refrigeración</li> <li>- Diluido en TEY y Médium Test en congelación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Años.</li> </ul>	
Órganos	Muestra no menos a 3 cm <sup>2</sup> en bolsas o frascos plásticas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El frasco o bolsa a - 70 °C.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indefinidamente.</li> </ul>	
Huesos y Dientes	Colocarlas en bolsas de plástico de cierre hermético.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A temperatura ambiente sin conservadores.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Largos periodos de tiempo.</li> </ul>	

ECTOPARÁSITOS				
Piel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Raspado de piel usando una hoja de bisturí y glicerina, la muestra se coloca entre dos portaobjetos fijados con una liga, en frascos pequeños o en sobres de papel limpio.</li> <li>- En el caso de miasis subcutáneas, se colectan por extracción manual haciendo presión sobre las heridas hasta lograr la expulsión de las larvas.</li> <li>- En las miasis cavitarias, las larvas se colectan haciendo lavados con solución de Sodio al 2 % o a la necropsia.</li> <li>- En el caso de las garrapatas, la colección es por extracción manual.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A temperatura ambiente.</li> <li>- La muestra se lava con agua y se conservan en alcohol de 70° a temperatura ambiente.</li> <li>- En un frasco con alcohol de 70° a temperatura ambiente.</li> <li>- En un frasco con la tapa perforada y con papel filtro humedecido para mantenerla vivas, a temperatura ambiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indefinidamente.</li> <li>- Indefinidamente</li> <li>- Mientras se mantengan vivas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Para la identificación de ectoparásitos, bacterias y hongos.</li> <li>- Identificación de las garrapatas.</li> </ul>
Conducto auditivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Con un hisopo directo en el oído, con movimientos circulares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En bolsas plásticas a temperatura ambiente.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificación de los ectoparásitos.</li> </ul>
Pelo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Por cepillado colocando el material en el centro de un papel.</li> <li>- Arrancando el pelo utilizando pinzas.</li> <li>- Con cinta adhesiva de acetato de 10 cm de longitud, presionando repetidas veces en las áreas sospechosas, pegando la cinta en un porta objeto.</li> <li>- Los artrópodos (piojos, pulgas) se colectan impregnando una torunda de algodón con alcohol o éter y se frota sobre el animal varias veces.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En sobres de papel.</li> <li>- A temperatura ambiente.</li> <li>- En frascos con alcohol a 70 ° a temperatura ambiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Indefinidamente</li> </ul>	

<b>DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO</b>				
Sangre	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En tubos con citrato de Na al 3.8% o con EDTA.</li> <li>- Filtro: colocar las gotas de sangre sobre un filtro grueso comercial tipo Whatman, hasta formar manchas de 1 a 2 cm de diámetro.</li> <li>- Frotis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En refrigeración (4°C).</li> <li>- Una vez seca las muestras a temperatura ambiente, se conserva en bolsas plásticas autosellables en ambiente seco.</li> <li>- A temperatura ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 24 horas o 15 días.</li> <li>- Varios días</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cultivo de bacterias para la detección e identificación de cualquier bacteria que puede estar presente en la sangre.</li> <li>- Detección de anticuerpos contra algunos patógenos (bacterias).</li> <li>- Identificar la presencia de bacterias</li> </ul>
Suero	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En tubos estériles sin anticoagulantes, para la centrifugación y obtener el suero.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En temperatura ambiente (20 a 30° C).</li> <li>- En refrigeración (4° C).</li> <li>- En congelación (-15 a -20° C).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Un día.</li> <li>- 4 días.</li> <li>- Indefinidamente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Niveles de anticuerpos específicos en sangre contra la bacteria buscada.</li> </ul>
Heces	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Directamente del recto, en forma estéril en un frasco estéril de tapa rosca.</li> <li>- Con un hisopo con medio de transporte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Refrigeración (4°C).</li> <li>- En medio de transporte (Stuart) en refrigeración (4 °C).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 24 hrs.</li> <li>- mas de 24 hrs.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificación de las bacterias del tracto gastrointestinal por cultivo.</li> </ul>
Orina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se recomienda colectarla por cistocentésis o por cateterización, y en forma estéril, utilizando un frasco estéril y de cierre hermético.</li> <li>-Frotis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En refrigeración (4° C)</li> <li>- En medio de transporte</li> <li>- A temperatura ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2hrs.</li> <li>- Sin limitación de tiempo de transporte.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificación de las bacterias del tracto urinario por cultivo.</li> <li>- Identificar la presencia de bacterias</li> </ul>

<b>DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO (continuación tabla)</b>				
Piel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En lesiones planas con un raspado de piel con bisturí hasta lograr un sangrado, colocando una pequeña cantidad en un recipiente pequeño y estéril.</li> <li>- En lesiones sangrantes, impregnar un hisopo con movimientos de rotación sobre la zona raspada.</li> <li>- En pústulas y abscesos se debe limpiar la zona (rasurar en caso de absceso) y puncionar la lesión con una aguja estéril y tomar el material purulento con la ayuda de un hisopo o bien se puede aspirar el contenido con una jeringa y colocarlo en tubos de ensayo.</li> <li>- En vesículas frescas se colecta igual que en abscesos y si esta rota se debe obtener la mayor parte del epitelio para depositarlo en frascos estériles.</li> <li>- En biopsias de piel (usando técnica de biopsias)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En refrigeración en un sistema Culturette para el envío.</li> <li>- Hisopos en medios de transporte.</li> <li>- En refrigeración en tubos de ensayo con solución salina estéril, en el caso de vesículas es sin solución salina.</li> <li>- En un sistema Culturette.</li> <li>- En vesículas rotas, en frascos estériles con solución de glicerina bufferada.</li> <li>- En medios de transporte Stuart en refrigeración.</li> <li>- Refrigeradas o congeladas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 12 24 hrs.</li> <li>- Sin limitación de tiempo de transporte.</li> <li>- 12 a 24 hrs.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificación de las bacterias de la piel por cultivo.</li> </ul>
Mucosas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se pueden obtener de la mucosa rectal, vaginal o prepucial, nasal y conjuntival por medio de un hisopo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En refrigeración en un tubo cerrado con medio de transporte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 24-48 hrs o 15 días</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificación de la microbiota bacteriana de la muestra, por medio de cultivo.</li> </ul>
Órganos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En un frasco estéril sellado herméticamente de la manera más estéril posible, coleccionar de manera estéril de 3 cm<sup>2</sup>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Refrigerados a 4°C o congeladas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 24-48 hrs</li> <li>- 15-30 días</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificación de las bacterias de los tejidos por cultivo.</li> </ul>

<b>DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO (continuación tabla)</b>			
Líquidos de necropsia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Con hisopos estériles.</li> <li>- Con jeringas estériles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Medio de transporte comercial</li> <li>- Refrigeración</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificación de las bacterias de los líquidos obtenidos, por cultivo.</li> </ul>
Secreciones Auditivas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Con un hisopo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rodarlo en un portaobjeto, secarlo al aire y se tiñe con tinción hematológica.</li> <li>- Hisopos en medios de transporte y de cultivo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indefinidamente</li> <li>- Observación de cantidades relativas de bacterias (Bacilos, cocos, etc.)</li> <li>- Identificación de las bacterias del canal auditivo, por cultivo.</li> </ul>

**DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO**

Sangre	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En tubos con EDTA, lo mas aséptico posible.</li> <li>- Filtro: colocar las gotas de sangre sobre un filtro grueso comercial tipo Whatman, hasta formar manchas de 1 a 2 cm de diámetro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En refrigeración, adicionar 10.000 UI de penicilina, 410 mg de estreptomina, por muestra.</li> <li>- Una vez seca las muestras a temperatura ambiente, se conserva en bolsas plásticas autosellables en ambiente seco.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 12 hrs.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aislamiento viral, para la recuperación e identificación específica del agente virológico.</li> <li>- Detección de anticuerpos contra algunos patógenos.</li> </ul>
Suero	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En tubos estériles sin anticoagulantes, para la centrifugación y obtener el suero.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En temperatura ambiente (20 a 30°C).</li> <li>- En refrigeración (4° C).</li> <li>- En congelación (-15 a -20° C).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Un día.</li> <li>- 4 días.</li> <li>- Indefinidamente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Niveles de anticuerpos específicos en sangre contra los virus buscados.</li> </ul>
Heces	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 a 10 grs. de materia fecal en frascos de boca ancha.</li> <li>- Hisopo estéril.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Congelar en hielo seco.</li> <li>- Refrigerado con antibiótico y solución de Hanck.</li> <li>- En medio de transporte comercial o congelado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indefinidamente.</li> <li>- 3 a 12 hrs.</li> <li>- Indefinidamente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recuperación e identificación del virus y/o agente causal, en excremento.</li> </ul>
Orina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se recomienda colectarla por cistocentésis o por cateterización, y en forma estéril, utilizando un frasco estéril y de cierre hermético.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Refrigeradas en medio de transporte</li> <li>- Congeladas.</li> <li>- Todas las muestras deben ir con antibiótico y antimicótico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 24 hrs.</li> <li>- Indefinidamente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recuperación e identificación del virus y/o agente causal, en orina.</li> </ul>
Órganos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- De la manera más aséptica, cortar 3 cm<sup>2</sup> de tejido (también para piel).</li> <li>- Hisopos estériles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Húmedas en medio transporte estéril o glicerina bufferada, en envase hermético, en refrigeración.</li> <li>- Medio de transporte comercial.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recuperación e identificación del virus y/o agente causal, de los órganos.</li> </ul>
Líquidos de necropsia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Con jeringas estériles.</li> <li>- Con hisopos estériles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Refrigerada en envases herméticos.</li> <li>- Medio de transporte comercial.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recuperación e identificación del virus y/o agente causal, de los líquidos obtenidos.</li> </ul>

DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO				
Orina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se recomienda colectarla por cistocentesis o por cateterización, y en forma estéril, utilizando un frasco estéril y de cierre hermético.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A temperatura ambiente</li> <li>- En refrigeración (4° C)</li> <li>- En medio de transporte o de cultivo por inmersión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 hrs.</li> <li>- Más de 24 hrs.</li> <li>- Sin limitación de tiempo de transporte.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificación de los hongos encontrados en el tracto urinario por cultivo.</li> </ul>
Piel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rapado en seco de la piel usando una hoja de bisturí en sobres de papel limpio.</li> <li>- En las infecciones de piel por Malassezia o Candida la muestra puede colectarse utilizando un hisopo humedecido y estéril.</li> <li>- En micosis profunda se colecta con un hisopo el líquido drenado o en frascos estériles o con una biopsia de piel.</li> <li>- En micosis sistémica, se pueden enviar trozos de tejido afectado e bolsas de plástico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En recipientes estériles que se mantengan secos durante el transporte (los sobres de papel limpios son recipientes adecuados).</li> <li>- En medios selectivos para dermatofitos</li> <li>- Se manda en un medio de transporte apropiado.</li> <li>- En refrigeración.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificación y clasificación del hongo presente en la muestra.</li> </ul>
Pelo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El pelo debe ser arrancado con unas pinzas del margen de la lesión.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En contenedores secos y estériles (los sobres de papel limpios son recipientes adecuados).</li> <li>- En medio de transporte para hongos dermatofitos con el DTM.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificación y clasificación del hongo presente en la muestra de pelo.</li> </ul>
Secreciones Auditivas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Con un hisopo directo en el oído, con movimientos circulares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El hisopo se debe rodar en un portaobjetos limpio y seco, los cuales secan al aire y se pueden teñir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indefinidamente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La observación citológica de la laminilla, para observar levaduras e hifas fungicas.</li> </ul>

<b>DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO</b>				
Sangre	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colectar la sangre en tubos de ensaye con EDTA</li> <li>-Colectar una pequeña cantidad de sangre para realizar un frotis sanguíneo.</li> <li>- Filtro: colocar las gotas de sangre sobre un filtro grueso comercial tipo Whatman, hasta formar manchas de 1 a 2 cm de diámetro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En refrigeración.</li> <li>-Los frotis se deben secar bien y conservar a temperatura ambiente.</li> <li>- Una vez secas la muestra a temperatura ambiente, se conserva en bolsas plásticas autosellables en ambiente seco.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 24 horas</li> <li>- Indefinido.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Detección e identificación de cualquier parásito sanguíneo.</li> <li>- Detección de anticuerpos contra algunos patógenos</li> </ul>
Suero	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En tubos estériles sin anticoagulantes, para la centrifugación y obtener el suero</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En temperatura ambiente (20 a 30°C).</li> <li>- En refrigeración (4°C).</li> <li>- En congelación (-15 a -20°C).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Un día.</li> <li>- 4 días.</li> <li>- Indefinidamente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Niveles de anticuerpos específicos en sangre contra los parásitos buscados.</li> </ul>
Heces	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La muestra se obtiene directamente del recto y se coloca en un recipiente de plástico de boca ancha limpio</li> <li>- Frotis fecal: con un hisopo se toma una pequeña muestra de heces frescas y se unta a lo largo del portaobjetos y se deja secar al aire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En refrigeración (2 – 4 °C)</li> <li>- Con formol al 10% o formalina al 5% a temperatura ambiente.</li> <li>- A temperatura ambiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Mas de 3 semanas.</li> <li>- Por largo periodo de tiempo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detección e identificación de cualquier parásito en heces.</li> </ul>
Parásitos encontrados en las heces o a la necropsia.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Los parásitos visibles se lavan con agua fría y se conservan en frascos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- En frascos con formol al 10 % o alcohol al 70%, a temperatura ambiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indefinidamente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detección e identificación de cualquier parásito encontrado.</li> </ul>
Orina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La muestra se colecta por cualquiera de los métodos mencionados en ese capítulo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A la muestra de orina se le debe adicionar formol al 40% (2 gotas de formol por cada 30 o 40 ml de orina).</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detección e identificación de cualquier parásito en orina.</li> </ul>

MUESTRA	COMO SE COLECTA	COMO SE CONSERVA	TIEMPO PARA PROCESAR.	INFORMACION QUE PROPORCIONA.
<b>DIAGNOSTICO TOXICOLOGICO</b>				
Sangre	En tubos de EDTA	- Refrigeración. - Congelación.	- Indefinidamente	Detectar y cuantificar la concentración de sustancias toxicas circulantes en sangre
Suero	En tubos limpios sin anticoagulante, para obtener posteriormente el suero por centrifugación.	- Refrigeración (- 4 °C) - Congelación (- 15 a -20 °C)	- 4 días - Indefinidamente	
El examen toxicológico se puede realizar en sangre o suero, según la sustancia tóxica que se desea analizar (ver cuadro resumen)				
Heces	Colectarlas en bolsas o frascos de plásticos que sellen herméticamente.	En congelación	Indefinidamente	Detectar y cuantificar la concentración de sustancias toxicas para conocer el impacto de la contaminación ambiental, sobre los animales.
Orina	Se debe colectar en frascos de plástico de cierre hermético.	- En congelación. - Agregarle 0.1 gr de timol por cada 100 ml de muestra.	- Indefinidamente. - 24 hrs	
Pelo	- Debe ser cortado a ras de la piel y puestas en bolsas de polietileno, con cierre hermético. - Una porción de la muestra será envuelta en papel aluminio.	- Congelación.	- Indefinido.	
Piel	Las muestras obtenidas por biopsias se colocan en frascos o en bolsas de plástico con cierre hermético. - Una porción de la muestra será envuelta en papel aluminio.	- Congelación.	- Indefinidamente.	
Órganos	De una muestra colectada, una porción se coloca en papel de aluminio y otra en envases o bolsas de plásticas sellables herméticamente.	- Congeladas.	- Indefinidamente.	

MUESTRA	COMO SE COLECTA	COMO SE CONSERVA	TIEMPO PARA PROCESAR.	INFORMACION QUE PROPORCIONA.
<b>DIAGNOSTICO CITOLÓGICO</b>				
Piel	- Lesiones: se puede n colectar por impronta raspado o hisopo. - Masas palpables: aspiración de aguja fina	- En portaobjetos: secado al aire fijado en alcohol al 70 % fijado con citospray en frasco de vidrio con alcohol al 70 %.	- Indefinidamente.	- Morfología celular. - Identificación de procesos inflamatorios, bacterianos, virales, parasitológicos, micóticos, neoplásicos y procesos degenerativos.  - Etapa del ciclo estral en que se encuentra.
Mucosa rectal	Por medio de raspado.			
Secreciones Auditivas	Hisopos en canal auditivo.			
Órganos y tejidos	- Obtenidos en Necropsias o cirugías: usando improntas y raspados. - Con ayuda de ultrasonografía: por medio de punción con aguja delgada.			
Líquidos de cavidades	Aspirado con aguja y jeringa, para la realización de un frotis.			
Sangre	Con una gota de sangre se realiza el frotis.			
Mucosa vaginal	Por medio de un hisopo.			
Se recomienda teñir por lo menos una laminilla por seguridad ante la ruptura, o para prevenir problemas de tinción.				
<b>DIAGNÓSTICO HISTOLOGICO</b>				
Órganos y tejidos	- Biopsias de 0.5 a 2 cm <sup>3</sup> . - Necropsias.	- En frascos con formalina neutra al 10 % a temperatura ambiente.		- Diagnóstico histopatológico para identificar enfermedades (neoplasias, infecciosas, inflamatorias y degenerativas.

<b>INMUNOHISTOQUÍMICA</b>				
Piel, órganos y tejidos.	- Biopsias.	- Una parte a temperatura ambiente en Bouin o Formalina neutra al 10 % - Otra parte en congelación con nitrógeno líquido.	- Indefinidamente	- Información e identificación antígenos utilizando anticuerpos marcados.
<b>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA</b>				
Piel, órganos y tejidos.	- Muestras cuboides ≤ 1 mm por medio de un bisturí limpio.	- Fijación en glutaraldeído en frascos de boca ancha herméticos a temperatura ambiente.	-No mas de 6 horas en el fijador	- Diagnóstico de neoplasias. - Identificación de partículas virales nucleares y citoplasmáticos, cuerpos de inclusión en células

## 14. DISCUSIÓN

La mayoría de las investigaciones de los animales silvestres son conducidas por biólogos de vida silvestre, zoólogos y ecólogos sin la participación de un médico veterinario. Muchos proyectos de investigación, especialmente los que involucran animales en peligro de extinción o raros, pueden beneficiarse con la contribución de veterinarios u otros especialistas de la salud. Los veterinarios pueden colaborar en la identificación de enfermedades y su importancia ecológica en las poblaciones silvestres, determinando los efectos del impacto antropogénico y desarrollando opciones de manejo para la recuperación y rehabilitación <sup>16</sup>.

Si no existe un veterinario en el trabajo de campo, es importante que los responsables cuenten con herramientas que les permita valorar el estado de salud de los animales silvestres y coleccionar las muestras adecuadas, de forma idónea, para que estas puedan ser procesadas en el laboratorio y sus resultados sean confiables para la correcta interpretación <sup>16</sup>.

La mayor parte de la información sobre la colección y conservación de las muestras esta basada en animales domésticos y en condiciones óptimas, por lo que con respecto al tiempo que permanece viable la muestra para su análisis muchos autores solo mencionan que hay que mandarlas lo más pronto posible. <sup>22,31,39,32,27</sup>. En proyectos con fauna silvestre en vida libre muchas veces esto no es posible porque las capturas de animales pueden durar varios días, sin que las muestras puedan ser llevadas al laboratorio. Para estas situaciones aún hace falta información sobre el tiempo máximo que pueden durar las muestras viables para su análisis. Incluso en el caso de que la muestra no sea la óptima debido al tiempo que ha transcurrido desde que fue colectada o por las condiciones de su obtención, no se debe descartar la muestra ya que es muy valiosa y en muchos casos difícil de

volver a coleccionar, pero si tomar en cuenta el estado de ésta al momento de interpretar los resultados,.

En todos los casos es necesario que los investigadores de campo se apoyen en el personal del laboratorio que realizará las pruebas correspondientes para saber con que tipo de equipo cuenta el laboratorio y cual método utilizan para realizar los análisis o si existen algunas especificaciones adicionales. También es necesario que los investigadores de campo conozcan que algunas muestras pueden ser mas sensibles, requiriendo su análisis inmediato, por lo que no podrán ser conservadas para su análisis posterior <sup>18</sup>.

Por todo lo anterior, este manual se desarrolló como una guía en los diferentes trabajos de investigación con felinos silvestres en vida libre, ayudando a obtener la mayor información posible de cada salida de campo, evitando la pérdida de información valiosa por desorganización o falta de datos y el mal manejo de las muestras biológicas.

#### 14.1 Registros

Es importante contar con registros en campo porque el almacenar la información de manera estandarizada y organizada permite que dichos datos puedan ser analizados y comparados después, además de ser de utilidad al momento de interpretar los análisis de laboratorio<sup>16,18</sup>. Berry KH (2001) menciona que los investigadores de campo prefieren protocolos limitados a una página simple con respuestas que se vayan marcando (ver formatos de registros, anexo 2). Para tratar de obtener la mayor información posible se recomienda llenar parte de los formatos antes y después del manejo directo con el animal, de tal manera que solo se registren los datos indispensables mientras el animal esta anestesiado.

En el anexo 2 se incluye un formato modificado a partir de diversas referencias bibliograficas, para su uso en trabajos de campo con felinos silvestres.

## 14.2 Muestras de Sangre

Las técnicas de obtención y los sitios de colección de muestras sanguíneas propuestas por Sirios, (1995) y Gallegos (1986) en animales domésticos son aplicables a campo en felinos silvestres. De todos los diferentes análisis posibles que se pueden realizar con sangre, los que necesitan trabajarse rápidamente son el Hemograma y el cultivo bacteriológico para lo cual será necesario considerar contar con el equipo y el material específico en el campo<sup>22,31,39</sup>. El Hemograma, como lo menciona Deem (2001), se puede realizar en el campo si se cuenta con microscopio y centrífuga, de lo contrario se recomienda hacer un frotis sanguíneo, el cual puede ser conservado por mucho tiempo a temperatura ambiente. En el caso del cultivo bacteriológico lo idóneo sería realizar un primer sembrado en campo. Si la falta de equipo, material o condiciones no lo permiten y las muestras se conservan para su análisis varios días hasta la llegada al laboratorio, entonces los resultados que se obtengan deben ser interpretados con cautela, considerando el tiempo transcurrido. También se recomienda realizar un frotis sanguíneo para observar la presencia de bacterias en sangre. Para el análisis bioquímico el suero puede permanecer viable por largo tiempo para analizar la mayoría de los analitos sin que haya alteraciones en los resultados, a excepción de la glucosa ya que su consumo in vitro es muy rápido, cuando se tengan las posibilidades de mantener la muestra en congelación. Otros análisis que pueden realizarse a partir de suero congelado son el toxicológico, de vitaminas y minerales, serológico y el hormonal.

## 14.3 Muestra de heces.

La técnica de colección de muestras fecales descrita por Mariscal (2000) para animales domésticos puede ser aplicada en felinos silvestres que se encuentren bajo anestesia en campo<sup>29</sup>. Esta técnica consiste en tomar las heces directamente del recto del animal y es la forma óptima de colectarlas para el examen bacteriológico. Estas muestras se deben enviar lo más pronto posible al laboratorio.

Para los análisis de genética, hormonales y estudios de hábitos alimenticios, que son muy utilizados en fauna silvestre, las muestras pueden ser colectadas de las trampas o del suelo sin que esto altere los resultados<sup>55,17,56</sup>. Esto hace que este tipo de muestra sea muy valiosa, ya que en muchas ocasiones, no es necesario realizar un manejo con el animal, ya que es un método no invasivo.

#### 14.4 Muestra de orina

Para la mayoría de los análisis que se realizan a partir de una muestra de orina, todos los autores recomiendan analizarlos lo mas pronto posible<sup>69,65,66,64,88</sup>, a excepción del estudio toxicológico en el cual Medway y Prier (1990) mencionan que se puede conservar la muestra en congelación casi indefinidamente<sup>59</sup>. Por lo tanto, lo mejor es trabajar la muestra en campo, lo que requiera del material y equipo adecuado.

#### 14.5 Muestras de piel, pelo, mucosas y ectoparásitos

Las técnicas de colección de muestras de pelo, piel, mucosas y ectoparásitos descritas para animales domésticos son aplicables a felinos silvestres en campo<sup>27,59,70,38</sup>. En el caso del examen bacteriológico, las muestras deben enviarse lo más pronto posible al laboratorio cuando no se cuenta con el material adecuado para hacer el sembrado en campo. Es importante mencionar que para este tipo de análisis la forma de colectar la muestra y el tiempo que dura la muestra va a depender muchas veces del tipo de bacterias que se quieran aislar.

El pelo se puede almacenar a temperatura ambiente por largo tiempo para el análisis hormonal y genético. Las muestras de pelo y piel congeladas para el análisis toxicológico dura varios meses. Para el estudio histopatológico el tejido conservado en formalina neutra al 10% a temperatura ambiente puede durar varios años.

#### 14.6 Muestras para citología

Este tipo de muestras se obtienen a partir de felinos silvestres anestesiados.

No existen diferencias en la técnica de obtención o conservación de muestras para su estudio citológico, ni tampoco para la realización de extendidos de la muestra o el tiempo que duran estas para su análisis en comparación con lo descrito en animales domésticos.<sup>71,36,86,84</sup>

#### 14.7 Aparato reproductor

Para poder realizar todas las evaluaciones de semen se necesita que los espermatozoides estén vivos, a excepción de las pruebas de concentración, morfología y genética. Debido a esto es indispensable contar con el equipo y material necesario para que la evaluación completa del semen se pueda realizar en campo, ya que no es posible conservar la muestra para su análisis posterior.<sup>45,62,93</sup>

#### 14.8 Necropsia

Las técnicas de necropsia para animales domésticos descritas por López (2000), no presentan grandes diferencias con las técnicas de necropsia descritas por Munson (1999) para felinos silvestres. Tampoco la forma de obtención de órganos, muestras de suero, orina y heces a partir de un cadáver, siendo aplicables a condiciones de campo en animales silvestres.<sup>85,32,100</sup>

#### 14.9 Envío de muestras

El correcto envío de las muestras es muy importante para asegurar su conservación y viabilidad sobre todo en las salidas a campo donde hay que transportarlas en distancias muy largas. Las recomendaciones de envío propuestas por Munson (1999)<sup>50</sup>, deben considerarse para poder contar con el material y equipo necesario, evitando la pérdida de muestras irremplazables<sup>50</sup>.

## 15. CONCLUSIÓN

Este manual es una herramienta para los investigadores que trabajan en campo con felinos silvestres, como apoyo para seleccionar la mejor opción para coleccionar y almacenar muestras de forma adecuada para su análisis en el laboratorio que permitan valorar el estado de salud de los animales.

El llenado de los registros que se proponen en este trabajo es factible de realizar en condiciones de campo. La técnica de obtención y los sitios de colección de muestras sanguíneas para animales domésticos no varía en felinos silvestres.

Para muchos análisis de laboratorio no existe suficiente información publicada sobre el tiempo máximo que puede durar la muestra viable para su análisis, por lo que es importante apoyarse del personal del laboratorio para la toma de decisiones y la elección de la mejor opción.

El suero es una muestra muy valiosa y si se cuenta con los medios para mantenerla congelada, se puede almacenar por largos periodos de tiempo, pudiendo usarse para análisis bioquímico, toxicológico, de vitaminas y minerales, serológico y hormonal.

Sin embargo el hemograma es un análisis que se debe realizar en campo y de no ser posible, se recomienda hacer frotis sanguíneos, que también se pueden utilizar para la observación de parásitos y bacterias, los cuales se conservan por mucho tiempo.

La técnica de colección de muestras fecales en animales domésticos se pueden utilizar en felinos silvestres y su conservación a temperatura ambiente con alcohol,

etanol y formol permite realizar posteriormente el análisis de genética, hormonal y paraitológico.

La muestra de orina no puede ser conservada durante mucho tiempo para realizar en ella la mayoría de los exámenes (urianálisis, análisis virológico y bacteriológico), por lo que es preferible trabajarla en campo.

No existen diferencias en las técnicas de colección de muestras de pelo, piel, mucosas y ectoparásitos para animales domésticos en comparación con felinos silvestres, y estas pueden conservarse a temperatura ambiente para la realización de análisis hormonal y genético, con formol para análisis histopatológico.

Independientemente del tipo de muestra que se trate, si se desea realizar un cultivo bacteriológico esta debe mandarse al laboratorio lo más pronto posible o bien realizar un sembrado en campo para continuar con su análisis posteriormente.

La técnica de colección y conservación de muestras para su estudio citológico en felinos silvestres que se encuentran anestesiados es igual que en animales domésticos y estos extendidos en las laminillas pueden conservarse a temperatura ambiente, por varias semanas si no están teñidas, una vez teñidas duran años para realizar su análisis.

La evaluación completa del semen se debe realizar en campo, por lo tanto se requiere contar con el material y el equipo necesario para el análisis de esta muestra.

No hay diferencias en la técnica de necropsia, la forma de obtención de órganos, suero, heces y orina de un cadáver utilizadas en animales domésticos que en felinos silvestres, así como tampoco en las técnicas para conservación de las muestras o el tiempo que pueden ser viables.

Es importante elegir la forma adecuada para el envío de las muestras y asegurar su viabilidad, por lo que será necesario poder contar con el material y equipo específico.

## 16. LITERATURA CONSULTADA

1. Mares M.A. and Schmidly D.J.; Latin American Mammalogy History, Biodiversity and Conservation. Quinta edition. Eds. Oklahoma University USA. 1991.
2. Ramírez-Pulido y Castro-Campillo (en prensa). Diversidad mastozoológica en México, Volm. Espc. XLIV. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 1993, pp. 413 – 427.
3. Mittermeier, R.A. y Goetsch de Mittermeier.; La importancia de la diversidad biológica de México. In: J.Sarukhán y R. Dirzo (compiladores) *México ante los retos de la biodiversidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la biodiversidad. México, D.F., 1992, pp.63-73.
4. Cervantes A.F., Castro-Campillo A., y Ramírez -Pulido J.; Mamíferos Terrestres Nativos de México, Anales Inst. Biol. Univ. Autón. México, Ser. Zool. 1994, 65(1):177-190.
5. López C, González A, Hidalgo MG, Cantu L. Ecología y Conservación de la Comunidad de Carnívoros del Bosque Tropical Deciduo en el Occidente de México. [Enero 6 2003]. Disponible en URL: <http://pp.terra.com.mx/~rhidalgo/marcos.html>
6. Shoemaker AH, 1996 Taxonomic and legal status of the felidae [Enero 6 2003]. Disponible en URL: <http://www.felidtag.org/>
7. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Gaceta Ecológica 62, Legislación Ambiental. México (DF): SEMARNAT, enero-marzo 2002.
8. Caso Arturo. Home range and habitat use of 3 neotropical carnivores in northeast, México. Tesis of Master of Science., Texas, E.U.A.: Texas A & M. University, 1994.
9. Robinson WL, and Bolen EG. Wildlife Ecology and Management. Second Edition. Macmillan Publishing Co. New York. 1989, 574 pp.
10. Colodner AG, Martínez-Gallardo R, Mercado RJA. Evaluación del estado de salud de la población de borrego Cimarrón *Ovis canadensis cremnobates* (Artiodactyla: Bovidae) de la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. Memorias del XVII Simposio sobre fauna silvestre "Gral. MV. Manuel Cabrera Valtierra; 2000 Noviembre 22-24. México D.F. FMVZ. UNAM; 2000:117-120.
11. Munson L.; Scope and Magnitude of Disease in Species Conservation, Animal Movements and Disease Risk a Workbook. Tercera Edición; 2002 octubre 15-17; Puebla, México.
12. Mörner T, Obendorf DL, Woodford MH. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. Revue Scientifique et Technique. Off. int. Epiz., 2002, 21(1), 67-76.
13. Gordon BR. Infectious diseases of wildlife: detections, diagnosis and management. Revue Scientifique et Technique. Off. int. Epiz., 2002, 21(1), 399.
14. Cooper JE. Diagnostic pathology of selected diseases in wildlife. Revue Scientifique et Technique. Off. int. Epiz., 2002, 21(1), 77-89.
15. García MM. Aspectos veterinarios en programas de traslocación y reintroducción de especies amenazadas. [septiembre 23 2002] Disponible en URL:

<http://www.redvya.com/veterinario/veterinario/especialidades/exoticos/especialista/Silvestres/articulo01.htm>

16. Berry KH and Christopher MM. Guidelines for the field evaluation of desert tortoise health and disease. *J. Wildlife diseases* 2001; 37:427-250
17. Deem SL and Karesh W. Manual del programa de salud del jaguar. Editor Wildlife conservation society 2001.
18. Buck WB. Diagnóstico de las intoxicaciones. En: *Toxicología Veterinaria Clínica y Diagnostica*. Editor Aribia, Zaragoza (España) 1981:50-58
19. Sirois M. *Mosby's Fundamentals of Veterinary Technology. Veterinary Clinical Laboratory Procedures*. New York: Mosby, 1995.
20. Clark RK, Jessup DA. *Wildlife Restraint Series en Español*. 1era ed. California: IWVS, Inc. Publications, 1993.
21. Dyce KM. *Anatomía Veterinaria*. México: Médica Panamericana, 1991.
22. Jakob-Hoff R. The Collection, Storage and Transport of Diagnostic Samples From Birds and Reptiles. *Animal Movements and Disease Risk*; 2002 octubre 15-17; Puebla (Puebla) México: Africam Safari. Internacional Fund for Animal Welfare, 2002: 77-110
23. Benjamin MM. *Manual de Patología Clínica Veterinaria*. 2<sup>da</sup> reimpresión. México: Limusa, 1990.
24. Voigt GL. *Conceptos y técnicas hematológicas para técnicos veterinarios*. Zaragoza (España): Editorial Acribia, 2003.
25. Mellen, J.D.; Factor Influencing Reproductive Success In Small Captive Exotic Felids (Felis Spp): A Multiple Regression Analysis. *Zoo Biology* 10; 95-110; 1991.
26. Coffin DL. *Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria*. 3<sup>a</sup> ed. México: Colecciones Científicas. La Prensa Médica Mx, SA, 1986.
27. Gallegos M. *Manual de colección, preservación y envío de muestras para análisis de laboratorio en cerdos (tesis de licenciatura)*. México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1986.
28. Sarstedt. *Técnica de uso de tubos S-Monovette* [Septiembre, 2004]. Disponible en URL: <http://www.sarstedt.com/php/main.php>
29. Mariscal QG. *Indicaciones en la recolección y envío de muestras*. Primer curso de Patología clínica aplicada a la práctica de pequeñas especies; 2000 febrero 2-4; México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios de Oriente, AC, 2000:1-5
30. García RC. *Toma, conservación y envío de muestras hematológicas*. Diplomado en Hematopatología en animales domésticos y silvestres: 2003-2004 septiembre-julio; México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, División de Educación Continua, 2003.
31. Blas Y. *Manual de hematología aviar (tesis de licenciatura)*. México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1993.
32. Gallegos MR. *Manual de recolección y preservación de muestras para el laboratorio en ovinos y caprinos (tesis de licenciatura)*. México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1985.
33. Kraft H. *Métodos de laboratorio clínico en medicina veterinaria de mamíferos domésticos*. 3<sup>a</sup> Edición. Zaragoza: Editorial Acribia, 1998.

34. Davey RF, Nelson DA. Transtornos leucocitarios. En: John BH., editor, Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio. Tomo 1, 8ª edición Salvat Editores Barcelona España 1990.
35. Balcells AG. La clínica y el Laboratorio. Salvat Editores. México 1990
36. Tyler RD, Cowell RL, Baldwin CJ, Morton RJ. Introducción. En: Cowell RL, Tyler RD, editores. Citología y Hematología Diagnóstica en el perro y el gato. Barcelona: Multimédica, 1999: 1-19.
37. Bush BM. Manual de Laboratorio Veterinario de Análisis Clínicos. Zaragoza (España): Ed. Acribia, 1982.
38. Manual de Química Sanguínea Veterinaria. [Octubre, 2003]. Disponible en URL: <http://www.monografias.com>
39. Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinarias. México (DF): UNAM, 1997
40. Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Manual de Prácticas de Laboratorio de Parasitología. México (DF): UNAM, 1998.
41. Malherbe WB. Parásitos sanguíneos. En: Medway W, editor. Patología Clínica Veterinaria. México: UTEHA, 1990: 358-370.
42. Prier FE, Strachan SD. Técnicas para diagnóstico viral. En: Medway W, editor. Patología Clínica Veterinaria. México: UTEHA, 1990: 400-429.
43. Volmer PA, Meerdink GL. Diagnostic toxicology for the small animal practitioner. *Vet Clin Small Anim* 2002, 32:357-365.
44. Davidson WR, Nettles VF. Field Manual of Wildlife Diseases in the Southeastern United States. 2nd ed. USA (Georgia): Southeastern Cooperative Wildlife Disease Study, 1997.
45. Ugaz CM. Efecto de la suplementación alimenticia sobre la calidad seminal de los ocelotes (*Leopardus pardalis*) en cautiverio (tesis de maestro en ciencias). Ciudad de México (México DF) México: Universidad Autónoma de México, 2004.
46. University of Arizona. ADN en medicina legal: Grupo de problemas n° 3, Problema 6: Fuentes de ADN. EUA (Arizona) 1996 [15/Julio/2004]. Disponible en: URL: [http://biologia.arizona.edu/human/problems:sets/DNA\\_forensics\\_2/06t.html](http://biologia.arizona.edu/human/problems:sets/DNA_forensics_2/06t.html)
47. Duarte A. Análisis de paternidad en ovinos por microsatélites. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas [publicación online] 2000. Disponible en: URL: <http://fmvz.uat.edu.mx/Investigacion/alfabetico/Paternidad-ovinos.pdf>
48. Buckles J. Scientists snare bear hair for DNA analysis. *Genome News Network* [online publication] July 21 2000 [citado 15 julio 2004]. Disponible en: URL: [http://www.genomenewsnetwork.org/articles/07\\_00/snare\\_bear\\_hair.shtml](http://www.genomenewsnetwork.org/articles/07_00/snare_bear_hair.shtml)
49. Chieri P. Identificación de equinos por análisis de ADN. Asociación Argentina de veterinaria equina. [serial online] [citado 15/Julio/2004]. Disponible en: URL: [http://www.vidaquestre.com.ar/aavequina/identificacion\\_adn.htm](http://www.vidaquestre.com.ar/aavequina/identificacion_adn.htm)
50. Munson L. Procedimientos de Necropsia para animales silvestres. California: Wildlife Conservation Society, 1999. Disponible en URL: <http://www.vetmed.ucdavis.edu/whc/necropsy/toc.html>.

51. Laboratorio Médico Veterinario Ltda. Manual de toma, almacenamiento y transporte de muestras para diagnóstico veterinario. [citado 05/Septiembre/2003]. Disponible en: URL: <http://www.lmvtlda.com/lab/manual/index.html>
52. Kohn MH and Wayne RK. Facts from feces revisited. TREE 1997; 12: 223-227.
53. Méndez E. Los roedores de Panamá. Panamá: Impresora Pacífico, 1993.
54. Chinchilla FA. La dieta del jaguar (*Pantehra onca*), el puma (*Felis concolor*) y el manigordo (*Felis pardalis*) (Carnívora: Felidae) en el Parque Nacional Corcobado, Costa Rica. Rev Biol Trop 1997; 45: 1223-1229.
55. Farrell LE, Roman J, Sunquist ME. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. Molecular Ecology 2000; 9: 1583-1590.
56. Terio KA, Brown JL, Moreland R, Munson L. Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroid in the cheetah. Zoo Biology 2002; 21: 215-222.
57. Radeleff RD. Toxicología veterinaria. León, España: Editorial Academia, 1967.
58. Lorgue G, Lechenet J, Riviere A. Toxicología clínica veterinaria. Zaragoza: Editorial Acribia, 1997.
59. Medway W, Prier FE. Selección y envío de materiales. En: Medway W, editor. Patología Clínica Veterinaria. México: UTEHA, 1990: 1-13.
60. Mora MA, Laack LL, Lee MC, Sericano J, Presley R, Gardinali PR, Gamble LR, Robertson S, Frank D. Environmental contaminants in blood, hair and tissues of ocelots from the lower Rio Grande Valley, Texas, 1986 – 1997. Environmental Monitoring and Assessment 2000; 64: 477-492.
61. Reagor JC. Sampling and handling of samples specific analyses and diagnostic principles on poisonous conditions. Memorias del primer curso de actualización en toxicología veterinaria; 1978, Ciudad Universitaria (DF) México. México (DF) : Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1978: 1-10.
62. Morag K. Veterinary laboratory medicine. 2nd ed. USA: Blackwell Science, 2002
63. Bouda J, Quiroz RG. Empleo de Pruebas de Función Renal y Urianálisis en Diagnóstico. Memorias de la Tercera Jornada Internacional de Patología Clínica Veterinaria; 2002 Abril 26-28; Ciudad Juárez (Chihuahua) México. México (DF): Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento Pecuario, Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2002: 23-39.
64. Osborne CA, Stevens JB. Urianalysis: A clinical Guide to Compassionate Patient Care. Kansas: Bayer, 1999.
65. Meyer DJ, Harvey JW. El Laboratorio en Medicina Veterinaria. Interpretación y Diagnóstico. 2nd ed. Buenos Aires: Intermédica, 2000.
66. Lobingier R, Zinkl JG. Urianalysis. En: Pratt PW, editor. Laboratory Procedures for Veterinary Technicians. USA: Mosby, 1992: 265-304.
67. Wade B, Brown M. Urianalysis, Hematology, Citology. En: Tighe BM, editor. Comprehensive Review for Veterinary Technicians. Canada: Mosby, 1998: 231-248.
68. Carter GR. Recomendaciones generales: especímenes e interpretaciones de reportes. IVIS, Internacional Veterinary Information Service [serial online] 2001 July [citado 13/mayo/2003]. Disponible en: URL:[http://www.ivis.org/speciel\\_books/carter2\\_es/chapther\\_frm.asp?LA=2](http://www.ivis.org/speciel_books/carter2_es/chapther_frm.asp?LA=2)

69. Rejas GF. Pruebas Laboratoriales Microbiológicas. Aplicaciones Diagnósticas. En: Prieto MF, editor. Exploración Clínica Veterinaria. Madrid: Ediciones Universidad de León, 1999: 437- 470.
70. Curtis CF. Diagnostic Techniques and Sample Collection. Clinical Techniques in Small Animal Practice 2001, 16: 199-206.
71. De Buen N. Citología Diagnóstica. En: Valero G, editor. Diagnóstico Veterinario, requisitos, procesos, interpretación, ventajas y desventajas de técnicas diagnósticas. [Libro CD-ROM]. 3ra edición. México DF; 2000; 73-75.
72. López LA, Brousset DM, Caso A, Sandoval H, Verdugo A. Identificación de la microbiota bacteriana aerobia en carnívoros silvestres del Noreste de México. Memorias de XIX simposio sobre fauna silvestre "Gral MV Manuel Cabrera Valtierra"; 2002 Noviembre 27-29; Ciudad Universitaria (DF) México. México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2002: 161.
73. Romero A, Días E, Ontiveros ML, Arellano B, Tenorio VR. Toma y envío de muestras para diagnóstico de enfermedades bacterianas y micóticas. En: Valero G, editor. Diagnóstico Veterinario, requisitos, procesos, interpretación, ventajas y desventajas de técnicas diagnósticas. [Libro CD-ROM]. 3ra edición. México DF; 2000; 109-117.
74. Castañeda NY. Efecto de la raza en el perfil general de sangre, leche y lana de ovejas en pastoreo (tesis de Maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.
75. Koren L, Mokady O, Karaskov T, Klein J, Koren G, Geffen E. A novel method using for determining hormonal levels in wildlife. Animal Behaviour 2002, 63: 403-406.
76. Yang HZ, Lan J, Meng YJ, Wan XJ, Han DW. A preliminary study of steroid reproductive hormones in human hair. J steroid Biochem Molec Biol 1998, 67: 447-450.
77. Wheeler MJ, Zhong YB, Kicman, Coutts SB. The measurement of testosterone in hair. J Endocrinology 1998, 5: R5-R8.
78. DNA: Solutions LLC. Pruebas y sistemas de calidad de la prueba de paternidad humana. August 29 2000 [citado junio 2004]. Disponible en: URL:<http://www.dnanow.com>
79. Spengler R. Hair analysis. [publicación online] November 27 2002 [citado 15 Julio 2004]. Disponible en: URL:[http://my.webmd.com/hw/health\\_guide\\_atoz/aa81648.asp](http://my.webmd.com/hw/health_guide_atoz/aa81648.asp)
80. Ministerio del interior. Dirección de Policías. Laboratorio de Biología-ADN. Análisis de ADN en criminalística I. Revista de Biólogos del Colegio oficial de Biólogos de la Comunidad de Madrid 2002, 2: 3er trimestre. Disponible en: URL:[http://www.mir.es/policia/cgpc/pelos.htm?reload\\_coolmenus](http://www.mir.es/policia/cgpc/pelos.htm?reload_coolmenus)
81. Damian SM. Identificación de virus respiratorios en pulmones neumónicos de perros domésticos a través de Inmunohistoquímica (tesis de licenciatura). Ciudad de México (México DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.
82. Haines DM, Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. J Vet Diagn Invest 1991, 3:101-112

96. Esquivel CF. Inseminación artificial en caninos. Estudio recapitulativo (tesis de licenciatura). Ciudad de México (México DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1990.
97. Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. México: Mc Graw Hill, 2002: 375 – 386.
98. Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL. A simple staining methods for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. J. Zoo Wildlife Med 1991; 22: 87.
99. López A. Inspecciones de cadáveres y descripción de lesiones macroscópicas. En: Valero G, editor. Diagnóstico Veterinario, requisitos, procesos, interpretación, ventajas y desventajas de técnicas diagnosticas. [Libro CD-ROM]. 3ra edición. México DF; 2000; 11-21.
100. Anzaldúa SR, Tolosa J. Manual de Prácticas de Histología Veterinaria. 2nd ed. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Morfología, 1997.
101. Maldonado JE, Orta F, Stewart BS, Geffen E, Wayne RK. Intraespecific Genetic Differentiation in California Sea Lions (*Zalophus Californianus*) from Southern California and the Gulf of California. Marine Mammal Science 1995, 11: 46-58.

## **17. ANEXOS**

## ANEXO 1 REGISTRO POR SALIDA

Fecha: \_\_\_\_-\_\_\_\_-\_\_\_\_ Temperatura Ambt.: \_\_\_\_ N° de trampas: \_\_\_\_  
 Hora de Salida: \_\_\_\_ Hora de Llegada: \_\_\_\_  
 Área de Búsqueda: \_\_\_\_\_

### Animales Capturados

Especie	Sexo	Edad Aprox.	Lugar	Observaciones

### Animales Observados

Especie	Lugar	Observaciones

### Actividad Humana

#### Personas:

Trabajadores	<input type="checkbox"/>	Estudiantes	<input type="checkbox"/>
Pobladores	<input type="checkbox"/>	Turistas	<input type="checkbox"/>
Investigadores	<input type="checkbox"/>	Niños	<input type="checkbox"/>

#### Animales Domésticos Observados:

Vacas	<input type="checkbox"/>	Gatos	<input type="checkbox"/>
Borregos	<input type="checkbox"/>	Gallinas	<input type="checkbox"/>
Cabras	<input type="checkbox"/>	Cerdos	<input type="checkbox"/>
Caballos	<input type="checkbox"/>	Otros:	_____
Perros	<input type="checkbox"/>		_____

#### Vehículos Observados:

Camión	<input type="checkbox"/>	Motocicleta	<input type="checkbox"/>
Camioneta	<input type="checkbox"/>	Cuatrimoto	<input type="checkbox"/>
Automóvil	<input type="checkbox"/>	Otros:	_____

Observaciones: \_\_\_\_\_

## ANEXO 2 REGISTRO INDIVIDUAL

Fecha: \_\_\_\_-\_\_\_\_-\_\_\_\_ País: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
 Investigador: \_\_\_\_\_  
 Área de Trabajo: \_\_\_\_\_  
 Área de Captura: \_\_\_\_\_ Sitio de Captura: \_\_\_\_\_  
 Localización de trampa (GPS): \_\_\_\_\_  
 Hora de Observación: \_\_\_\_-\_\_\_\_-\_\_\_\_  
 Tipo de Captura: \_\_\_\_\_

Especie: \_\_\_\_\_ Peso Estimado: \_\_\_\_\_  
 Actividad del Animal:  
 Agresivo  Aletargado   
 Alerta  Dormido   
 Indiferente  Otros \_\_\_\_\_

### CONTENCIÓN QUÍMICA

Nombre comercial/ Principio Activo	Concentración	Dosis (mg/K)	mg Totales	ml Totales	V.A.	Hora Aplicación	Hora Respuesta

V.A. :Vía de administración.

### Inducción:

Suave  Regular  Excitada

Tiempo de Inducción: \_\_\_\_\_ (min.)

### Respuesta a la Anestesia:

Excelente  Buena  Regular  Mala

Duración Total: \_\_\_\_\_ (min.)

Observaciones:

### Redosificación:

Hora: \_\_\_\_\_ : \_\_\_\_\_ : \_\_\_\_\_ : \_\_\_\_\_ : \_\_\_\_\_

Fármaco: \_\_\_\_\_

Dosis: \_\_\_\_\_

I.D. Animal: \_\_\_\_\_ Peso Real: \_\_\_\_\_ Kg. Sexo: \_\_\_\_\_

Edad Aproximada: \_\_\_\_\_

**CONSTANTES BIOLÓGICAS EN ANESTESIA:**

Hora	F. Card.	Pulso	S O <sub>2</sub> %	F. Respt.	Temperatura	T.LL.C.	Observaciones

T.LL.C. Tiempo de Llenado Capilar.

Comentarios:

\* En el caso de encontrar masas en el organismo, marcar en el cuadro correspondiente y describir en el apartado de masas

**INSPECCIÓN CLÍNICA**

			#	Pieza
<b>HOCICO:</b>	Normal	<input type="checkbox"/>		
	Lacerado	<input type="checkbox"/>		
	Hemorragia	<input type="checkbox"/>		
	Sucio	<input type="checkbox"/>		
	Cicatrices	<input type="checkbox"/>		
Otros:	_____			
	<b>DIENTES:</b>	Completos	<input type="checkbox"/>	
		Faltantes	<input type="checkbox"/>	
		Fracturados	<input type="checkbox"/>	
		°/ Sarro	<input type="checkbox"/>	
		Temporales	<input type="checkbox"/>	
		Definitivos	<input type="checkbox"/>	
	Otros:	_____		

**ENCÍAS:**

Normal

Intactas

Inflamadas

Laceradas

Hemorragias

Hematomas

Lubricación: Húmedas  Secas  Pegajosas

Color de Mucosas: Pálidas  Hiperemicas  Hemorrágicas  Ictéricas

Cianóticas  Petequias  Normal

Secreciones: Serosa  Mucoide  Mucopurulenta  Color: \_\_\_\_\_

Otros: \_\_\_\_\_

**LENGUA:**

Normal

Traumatismo

Masas

Otros: \_\_\_\_\_

**PALADAR BLANDO:**

Normal

Alargamiento

Masas

Traumatismo

Cuerpo Extraño

Otros: \_\_\_\_\_

Tipo: \_\_\_\_\_

**FARINGE:** Normal   
 Asimetría   
 Masas   
 C. extraño   
 Secreciones: Serosa  Mucoide  Mucopurulenta  Color: \_\_\_\_\_  
 Otros: \_\_\_\_\_

**NARIZ:** Normal   
 Lacerada   
 Húmeda   
 Masas   
 Secreciones: Serosa  Mucoide  Mucopurulenta   
 Izquierda  Derecha  Bilateral   
 Otros: \_\_\_\_\_

**OJOS:**

	Izq	Der		Izq	Der
Normal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Simetría	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Irritado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Estrabismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Opacidad	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Derrame		
Lacerado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ocular	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Enoftalmo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Masas en		
Exoftalmo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Párpado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Color de Mucosas: Pálidas  Hiperemias  Hemorrágicas  Ictéricas   
 Cianóticas  Petequias  Normal   
 Secreciones: Serosa  Mucoide  Mucopurulenta  Color: \_\_\_\_\_  
 Izquierdo  Derecho  Bilateral   
 Otros: \_\_\_\_\_

**OIDO:**

	Izq	Der	
Normal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Lacerado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Incompleto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Parásitos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cuales _____

Secreciones: Serosa  Mucoide  Mucopurulenta  Color: \_\_\_\_\_  
 Izquierdo  Derecho  Bilateral  Olor: \_\_\_\_\_  
 Otros: \_\_\_\_\_

**NÓDULOS LINFÁTICOS:** Normal      Aumentado

Mandibulares	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pre-escapulares	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inguinales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Popítleo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Otros: \_\_\_\_\_

**TÓRAX:**

- Normal   
 Costillas completas   
 Costillas fracturadas   
 Mal formaciones   
 Enfisema Subcutáneo   
 Masas   
 Otros: \_\_\_\_\_

**ABDOMEN:**

- Normal   
 Distensión   
 Otros: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**APARATO REPRODUCTIVO:****MACHO**

- PENE:** Normal   
 Lacerado   
 Irritado   
 Inflamado   
 Masas   
 Edema   
 Hematoma   
 Hemorragia

**HEMERA**

- VULVA:** Normal   
 Lacerada   
 Irritada   
 Inflamada   
 Masas   
 Edema   
 Hematoma   
 Hemorragia

Color de Mucosas: Pálidas  Hiperemicas  Hemorrágicas  Ictéricas   
 Cianóticas  Petequias

Secreciones: Serosa  Mucoide  Mucopurulenta  Color: \_\_\_\_\_  
 Otros: \_\_\_\_\_

**ESPÍCULAS:**

- Pequeñas   
 Medianas   
 Grandes   
 Otros: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**TESTÍCULOS:**

- |                              | Izq                      | Der                      |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Normal                       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Ausencia                     | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Asimetría                    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Consistencia                 | _____                    | _____                    |
| 1: flácido 2: Normal 3: Duro |                          |                          |
| Otros:                       | _____                    |                          |

**GLÁNDULAS MAMARIAS:**

- Normales   
 Masas   
 Otros: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**ZONA PERINEAL:**

- Normal   
 Hernias   
 Masas   
 Parásitos   
 Materia fecal

Consistencia: \_\_\_\_\_

Otros: \_\_\_\_\_

**EXTREMIDADES**

	Anterior		Posterior	
	Izq	Der	Izq	Der
Normales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Laceradas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Parásitos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Costras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fracturas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dedos Incompletos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Uñas Rotas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Abscesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Área Interdigital				
Aumento Volúmen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eritema	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fístulas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C. extraños	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros:				

Cuales \_\_\_\_\_

**PIEL:** Integra   
 Lacerada   
 Cicatrices   
 Costras   
 Abscesos   
 Cuales \_\_\_\_\_  
 Eritema   
 Hematoma   
 Pigmentación : \_\_\_\_\_  
 Masas

Alopecias   
 Edema   
 Crepitación a la presión   
 Parásitos

Pliegue cutáneo \_\_\_\_\_ segundos

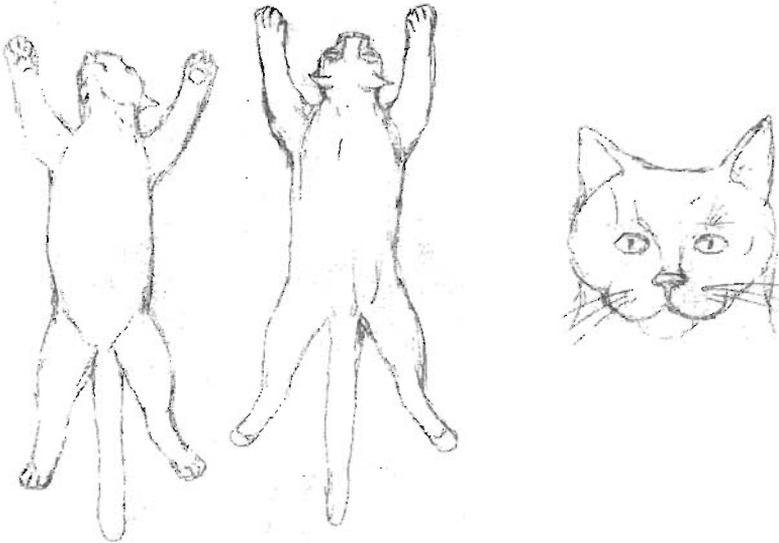
**PELO**

Suave  Áspero   
 Seco  Graso  Normal   
 Brillante  Mate

Otros: \_\_\_\_\_

**MASAS**

Tamaño \_\_\_\_\_ cm  
 Consistencia Duro  Blando  Intermedio   
 Adhesión: Adherido  Móvil

**LOCALIZACIÓN DE LESIONES O MARCAS**

Parásitos    Lacerada    Edema    Cicatrices    Costras    Abscesos  
 Eritema    Hematoma    Masas

---

**CONDICIÓN CORPORAL**

Obeso/gordo  Buena  Delgada  Pobre/emaciada

**MEDIDAS**

Long. Cráneo-caudal: \_\_\_\_\_ cm

Long. Cráneo Sacral: \_\_\_\_\_ cm

Long. Biparietal: \_\_\_\_\_ cm

Long: Tarsal: \_\_\_\_\_ cm

Long. Miembro post: \_\_\_\_\_ cm

---

**RECUPERACIÓN DE LA ANESTESIA**

Suave  Regular  Excitada

Tiempo: \_\_\_\_\_

Uso de antagonista: SI  NO

Comentarios: \_\_\_\_\_

---

**MUESTRAS BIOLÓGICAS OBTENIDAS**

<b>Muestra</b>		<b>Cantidad</b>	<b>Medio de Conservación</b>	<b>Destino</b>	<b>Colector</b>
Sangre Entera	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Suero sanguíneo	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Frotis sanguíneo	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Orina	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Excremento	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Pelo	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Piel	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Parásitos externos	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Parásitos internos	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Semen	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Frotis vaginal	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Raspado cutáneo	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Secreciones	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Órganos	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
Otros:					
_____	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
_____	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____
_____	<input type="checkbox"/>	_____	_____	_____	_____

**OBSERVACIONES DEL MANEJO:** \_\_\_\_\_

Nombre de Investigador: \_\_\_\_\_

Nombre de asistente de formato: \_\_\_\_\_

**ANEXO 3**

**PROTOCOLO DE NECROPSIA DE FELINOS\***

(Tomado y modificado por Munson L, 1999)

INSTITUCIÓN:

UBICACIÓN:

IDENTIFICACIÓN \_\_\_\_\_ ESPECIE \_\_\_\_\_

SEXO \_\_\_\_\_ EDAD APROXIMADA \_\_\_\_\_

PESO \_\_\_\_\_ ¿CRÍAS? \_\_\_\_\_

FECHA DE MUERTE \_\_\_\_\_ FECHA DE NECROPSIA \_\_\_\_\_

HISTORIA: (brevemente resume señales clínicas, circunstancias de muerte y signos clínicos) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**HOJA DE TRABAJO DEL EXAMEN MACROSCÓPICO**

**REVISOR:**

\_\_\_\_\_

**CONDICIÓN GENERAL:** (Condición nutritiva, condición física)

Neonatos: examinar malformaciones (paladar hendido, miembros deformados, etc)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**PIEL:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO:** (Huesos, articulaciones, músculos)

---

---

---

**CAVIDADES DEL CUERPO:** (Grasa almacenada, los fluidos anormales)

---

---

---

**ÓRGANOS HEMOLINFÁTICOS:** (Bazo, nodos de la linfa, el timo)

---

---

---

**SISTEMA RESPIRATORIO:** (Cavidad nasal, laringe, tráquea, pulmones, nódulos linfáticos regionales)

Neonatos: determinar si ocurrió la respiración (flotan los pulmones en formalina?)

---

---

---

**SISTEMA CARDIOVASCULAR:** (Corazón, pericardio, grandes vasos)

---

---

---

**SISTEMA DIGESTIVO:** (Boca, dientes, esófago, intestinos, hígado, páncreas, nódulos linfáticos de mesenterio). En Neonatos: Presencia de leche en estómago

---

---

---

**SISTEMA URINARIO:** (Riñones, uréteres, vejiga urinaria, el uretra)

---

---

---

**SISTEMA REPRODUCTOR:** (Testículos/ovarios, útero, vagina, pene, prepucio, próstata, glándulas mamarias, la placenta)

---

---

---

**SISTEMA ENDÓCRINO:** (Adrenales, tiroides, paratiroides, pituitaria)

---

---

---

**SISTEMA NERVIOSO:** (Cerebro, cordón espinal, los nervios periféricos)

---

---

---

**ÓRGANOS SENSORIALES** (Ojos, orejas)

---

---

---

**DIAGNÓSTICO PRELIMINAR:**

---

---

---



## ELECTROEYACULACIÓN

NZP/RRP \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_  
 Ubicación \_\_\_\_\_  
 T° ambiente \_\_\_\_\_  
 Clínicos \_\_\_\_\_

Peso Kg. \_\_\_\_\_ lb \_\_\_\_\_  
 Tamaño de sonda \_\_\_\_\_  
 Electroeyaculador \_\_\_\_\_  
 Estado General de Salud \_\_\_\_\_

Especie \_\_\_\_\_  
 Crías \_\_\_\_\_  
 Nacido libre/cautivo \_\_\_\_\_

Studbook # \_\_\_\_\_  
 ISIS/Local # \_\_\_\_\_  
 Nombre \_\_\_\_\_

COLECCIÓN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Voltios												
mA												
Volumen												
Orina												
% Motilidad												
Status												
pH												
Opacidad												
Erección (+/-)												
Estímulos #												

pH \_\_\_\_\_  
 Volumen espermático total \_\_\_\_\_  
 esperm/ml (en millones) \_\_\_\_\_  
 Cantidad total de esperm \_\_\_\_\_  
 % motilidad total \_\_\_\_\_  
 Status total \_\_\_\_\_

<b>TESTICULOS</b>	izq	derch
Firmeza*		
Largo (cm)		
Ancho (cm)		
Volumen **		
Volumen total		

Comentarios Generales: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

ANESTESIA				
Droga	Dosis	Ruta	Tiempo	Resultados

Congelación  
 # Pellets \_\_\_\_\_  
 mot pre-cong \_\_\_\_\_  
 status pre-cong \_\_\_\_\_  
 concen pre-cong \_\_\_\_\_

Otras muestras  
 Semen fijado \_\_\_\_\_  
 Piel \_\_\_\_\_  
 Heparina \_\_\_\_\_  
 Otras \_\_\_\_\_

Pene \_\_\_\_\_  
 Espículas \_\_\_\_\_  
 \*1: duro, 2: normal, 3: flácido  
 \*\* Volumen:  $L \times A^2 \times 0.524$   
 \*\*\* Volumen total: Vol D + Vol I

Muestras de Suero	
#	tiempo
pre	
post 1	
post 2	
post 3	
15 min	
30 min	
45 min	
60 min	

\* Traducido de Ugaz, CM, 2004

HRI

8889-111004

LOT NO. 10441

# CRITOCAPS™

Micro-Hematocrit Capillary Tube Reader

Permits Reading of Packed Cell  
Volume Directly in Percentage  
*For In Vitro Diagnostic Use*

## DIRECTIONS FOR USE:

Place the centrifuged Micro-Hematocrit Tube vertically on the chart with the bottom edge of the CRITOCAP just touching the red line below the 0 percent line. The bottom of the column of blood should be at the "0" percent line. Slide the tube along the chart until the meniscus of the plasma intersects the "100" percent line. The height of the packed red cell column is then read directly as percent cell volume.

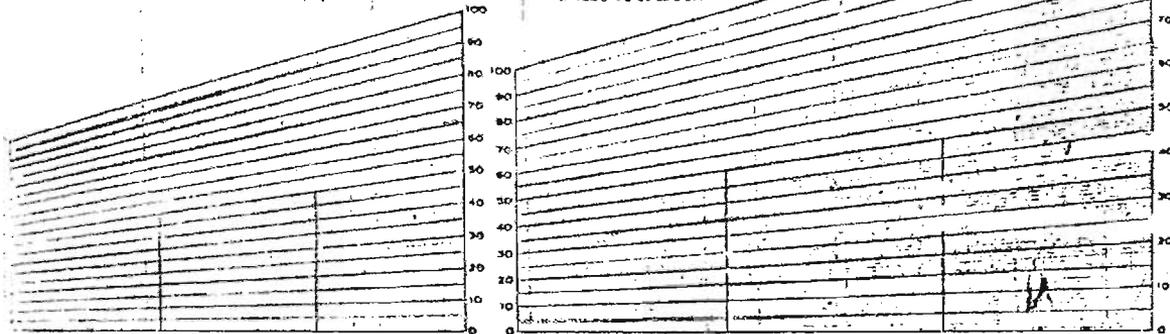
MANUFACTURED FOR

### MONOJECT

SCIENTIFIC

DIVISION OF SHERWOOD MEDICAL

ST. LOUIS, MO 63103 U.S.A.



M 753

ANEXO 6 (Tabla para leer el microhematocrito)



(Tomado y modificado de Back WB, 1981 y Volmer PA,2002)

## **ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EXAMEN TOXICOLÓGICO.**

- Las muestras deben colocarse en bolsas o en frascos de plástico
- Si se efectúan diversas tomas de muestras: colocar obligatoriamente cada muestra en un envase diferente.
- No añadir: antisépticos, conservantes, fijadores.
- No poner en contacto directo con la muestra materias absorbentes (algodón hidrófilo, gasas, tejidos, papel, etc.), que desecan totalmente las muestras.
- Cerrar herméticamente la bolsa o frasco.
- Identificar claramente la bolsa o frasco en su exterior (con la ayuda de una etiqueta, escrita con tinta indeleble).

### **Notas:**

- Pueden utilizarse frascos de vidrio, pero es necesario un embalaje protector importante y eficaz.
- No llenar totalmente los recipientes (tener cuidado con las fermentaciones, especialmente del contenido estomacal) <sup>58</sup>.

Es obligatorio y fundamental para el análisis de laboratorio:

- Nombre y direcciones completas de la persona que recolecto la muestra.
- Identificación del animal (especie, sexo, edad).
- Número de animales afectados y muertos.
- Naturaleza de las muestras.
- Descripción de los signos y lesiones encontradas.
- Cualquier indicación susceptible de orientar la investigación o los tóxicos responsables <sup>58</sup>.

Nunca se pedirá a un laboratorio químico que realice un análisis para descubrir venenos tan solo por que ha muerto un animal por causa desconocida. Existen centenares de productos químicos y vegetales que son tóxicos y sería imposible realizar análisis para todos ellos, no solo por la limitación de muestras disponibles si no también por que su costo sería prohibitivo. Además existen muchas plantas tóxicas e incluso algunos agentes químicos para los que no se dispone de métodos para su análisis químico <sup>18</sup>.

**ANEXO 8****EQUIPO NECESARIO PARA REALIZAR LA NECROPSIA <sup>50</sup>.**

Un equipo de necropsia básico puede prepararse para el traslado al campo en muy poco tiempo. Este debería contener los siguientes elementos:

**Vestimenta protectora**

Guantes de goma o látex

Botas de goma o similar

Delantal plástico o similar

Cubrebocas (que cubra nariz y boca)

Lentes

**Material de registros y documentación**

Cámara de fotos y rollos de fotos

Libreta de campo (formatos de registro)

**Equipo de necropsia**

Cuchillo bien afilado

Tijeras (pequeñas y grandes)

Pinzas de distintos tamaños

Hilo

Hacha pequeña

SERRUCHO O SIERRA PARA HUESOS

Martillo y cincel

Bisturís y hojas de bisturí

Mechero de alcohol o gas para esterilizar instrumental

Regla plástica o cinta métrica

**Envases para conservación de muestras y equipo de toma de muestras**

Envases de plástico duro con tapas de rosca herméticas (de aproximadamente un litro)

Envases pequeños herméticos, envases porta-tejidos o etiquetas para la identificación de muestras específicas

Envases estériles y tubos para colecta de sangre

Bolsas plásticas con cierre hermético (zip-lock)

Parafilm o cinta engomada para sellar

Papel aluminio

Jeringas y agujas estériles

Hisopos estériles con medio de transporte

Cinta para etiquetar, o etiquetas, marcadores indelebles, lápices

Portaobjetos y caja para transporte de portaobjetos

### **Materiales para el transporte**

Hieleras o conservadoras de campo

Envases herméticos, irrompibles

Material para envolver absorbente

Cinta de empaquetar

Glicerina estéril bufferada (50%) (Ver Anexo 9)

Solución "sangre fácil", para el transporte de células sanguíneas para análisis genético (Ver Anexo 9)

### **Fijadores**

Formol bufferado al 10 % (Ver Anexo 9)

Acetona 100% para citología

Alcohol etílico 70% para parásitos

### **Materiales de desinfección**

Cubeta y cepillo

Desinfectante

Bórax

Hipoclorito de sodio (0,5%)

Alcohol etílico al 70% (para desinfección de instrumental)

**ANEXO 9****FORMULACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA CONSERVACIÓN DE  
MUESTRAS**

(Munson L, 1999)

**Glicerina bufferada estéril (50%)**

Para el transporte de tejidos para cultivo cuando no se dispone de refrigeración en el campo.

Para preparar glicerina bufferada estéril, mezcle glicerina con partes iguales de un buffer compuesto por:

A. 21 g de ácido cítrico disuelto en 1000 de agua destilada

B. 28,4 g de fosfato de sodio anhidro, disuelto en 1000 de agua destilada

Mezcle 9,15 ml de A y 90,85 de B

Mezcle 100 ml de buffer con 100 ml de glicerina. Luego esterilice en pequeños tubos de ensayo apropiados para llevar al campo.

**"Sangre fácil"**

Para el transporte de ADN de células sanguíneas para análisis genéticos cuando no se dispone de refrigeración en el campo. Esta solución puede ser utilizada para preservar ADN por períodos prolongados si se refrigera o congela.

1,2 g de Tris HCl

3,7 g de Na<sub>2</sub> EDTA

2 g de dodecyl sulfato de sodio (SDS)

Agregar agua hasta 100 ml

**Formol 10% bufferado**

Para la fijación de tejidos para histología

Para preparar un litro, mezcle:

100 ml de formalina (formol al 38-40%)

900 ml de agua destilada

4 g de cloruro de sodio (sal de mesa)

## ANEXO 10

### INDICACIONES PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ÓRGANOS PARA ESTUDIOS DE HISTOPATOLOGICOS (Munson L, 1999).

#### TEJIDOS ENVIADOS:

Después de 72 hrs en fijador, envíe los tejidos sumergidos en formalina, en un recipiente adecuado para guardar y transportar tejidos húmedos. Las secciones del riñón congeladas necesitan ser enviadas en hielo lo antes posible.

#### TEJIDOS FIJADOS

Conserve los siguientes tejidos en formalina bufferada al 10% en una proporción de 1 parte de tejido en 10 partes formalina. Los tejidos no deben ser más gruesos que 1 cm. INCLUIR SECCIONES DE TODAS LAS LESIONES Y MUESTRAS DE TODOS LOS TEJIDOS (fundamentalmente de las áreas sospechosas).

#### - Aparato digestivo

**Tracto Gastro-Intestinal:** secciones largas de 3 cm de:

**Lengua:** sección cruzada cerca de punta que incluye ambas superficies de la mucosa.

#### **Esófago**

**Estómago:** secciones múltiples del cardia, fondo (cuerpo), y antro de píloro

**Intestino delgado:** duodeno, yeyuno, íleo.

**Intestino grueso :** ciego, colon.

**Omento :** aproximadamente 3 cm<sup>2</sup>.

**Páncreas :**secciones representativas de dos áreas que incluyen conductos centrales

**Hígado:** secciones de los 3 lóbulos, incluso la vesícula,

**- Aparato urinario.**

**Adrenal** : la glándula entera con incisión transversa.

**Riñón** : corteza y médula de cada riñón.

**vejiga urinaria, uretra, ureteres**: sección cruzada de vejiga y secciones de 2 cm de uretra y uretra.

**- Tracto Reproductor .**

**Utero**: entero

**Ovarios**: cortes longitudinales en el lumen de los cuernos uterinos.

**Testículos**: ambos testículos (con cortes transversales), epidídimo, próstata entera, todos con cortes transversales.

**- Aparato cardiorrespiratorio:**

**Pulmón**: Secciones de varios lóbulos incluso un bronquios mayor.

**Tráquea**

**Corazón**: secciones longitudinales incluso el atrio, el ventrículo y las válvulas de ambos lados.

**- Sistema nervioso**

**Cerebro**: Corte longitudinal a lo largo de la línea media del cerebro entero y la glándula pituitaria.

**Espina dorsal**: Secciones de la región cervical, torácica y lumbar.

**- Otros**

**Nódulos linfáticos**: Cervicales, mediastinales, bronquiales, mesentéricos y lumbares. Todos con cortes transversales.

**Timo**

**Bazo**: Secciones cruzadas incluso la cápsula.

**Ojo** : Ambos ojos intactos. Quitar los músculos extraoculares y tejidos periorbitales.

**Diafragma y el músculo esquelético**: Secciones cruzadas de músculos del muslo.

**Costilla abiertas o cortes longitudinales del medio del fémur**: la médula debe exponerse para la fijación apropiada.

**Piel**: El espesor completo de piel abdominal, labios y de la oreja.

**Tiroides/paratiroides**: intactas.

**Neonatos: cordón umbilical** : Incluir tejidos circundantes.

## ANEXO 11

**LISTADO DE TEJIDOS A MUESTREAR PARA MICROBIOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA** ( Tomado y modificado de Munson L, 1999)

<b>Tejido</b>	<b>Microbiología</b>	<b>Toxicología</b>
<b>Cerebro</b>	▲	▲
<b>Tejido adiposo</b>		▲
<b>Riñón</b>	▲	▲
<b>Contenido estomacal</b>		▲
<b>Pelo</b>		▲
<b>Hígado</b>	▲	▲
<b>Sangre entera</b>	▲	▲
<b>Nódulos linfáticos</b>	▲	▲
<b>Amígdalas</b>	▲	▲
<b>Bazo</b>	▲	▲
<b>Abcesos, granulomas</b>	▲	▲

## **ANEXO 12**

### **MUESTRAS PARA CULTIVOS ANAERÓBICOS.**

Las muestras para hacer cultivos anaerobios requieren de un manejo y transporte especial. El objetivo principal es evitar al máximo la exposición de la muestra al oxígeno y por lo tanto al aire, por lo que los hisopos son el método menos recomendado para coleccionar este tipo de muestras. Los fluidos para realizar cultivo anaerobios, se deben coleccionar con jeringas sin aire. Concluida la obtención la aguja se obtura con un tapón de goma clavado en ella y se dobla para prevenir la entrada de aire, y se transporta inmediatamente al laboratorio. Si las muestras para cultivo anaeróbico no pueden llegar al laboratorio antes de dos horas, deben colocarse en algún tipo de sistema de transporte anaerobio. Existen varios sistemas comerciales para dicho transporte. Los Port-A.Cul Systems contienen un medio de transporte prerreducido en agar blando con agentes reductores para mantener la anaerobiosis y ofrecen viales para las muestras fluidas, botes para tejidos pequeños, e hisopos y tubos para hisopos. También se pueden disponer de sistemas generadores de gas independientes que crean su propia atmósfera anaerobia, cuando la muestra se coloca en el recipiente y se sella el sistema. Estos están disponibles para hisopos (Anaerobic Cuturette, Becton Dickinson Microbiology Systems) y en forma de bolsas de plástico sellables (Bio-Bag, Gas-Pak Pouch, Becton Dickinson Microbiology Systems). Otro medio que se puede utilizar es el Amies con carbón activado. Es importante mencionar que las bacterias anaerobias no resisten la refrigeración por lo que este tipo de microorganismos se deben mantener a temperatura ambiente<sup>68,86</sup>.