

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA**

**INFORME FINAL DEL TRABAJO PROFESIONAL  
MODALIDAD AVES: LABORATORIO DIAGNÓSTICO  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**LÓPEZ FLORES ELSA ALEJANDRA**

**TUTOR**

**MVZ NÉSTOR LEDESMA MARTÍNEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres que tanto quiero y admiro. Gracias por todo el amor, confianza y apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida.

A mis queridos hermanos que siempre han estado conmigo, a los cuales admiro tanto. A esas lindas mujeres que complementan sus vidas. Gracias por todos los momentos juntos.

A mis tías que son un gran ejemplo de valor y fuerza.

A mis amigos gracias por la compañía en los momentos de crisis y sobre todo por llenar de música mi vida.

Al Dr. Néstor Ledesma por su confianza, su guía y su apoyo en este gran paso de mi carrera.

Al departamento de producción animal aves por su confianza, amistad y enseñanzas.

## CONTENIDO

	Página
Índice de cuadros.....	iii
Índice de figuras.....	iii
Abreviaturas.....	iii
Introducción.....	1
Medidas de seguridad implementadas.....	2
Área para la preparación de material usado en el laboratorio.....	3
Recepción de muestras.....	10
Área de bacteriología.....	15
Área de serología.....	27
Área de virología.....	36
Caso clínico.....	40
Conclusiones.....	43
Literatura citada	

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tiempo ideal de esterilización.....	7
Cuadro 2. Separación y envasado de los RPBI's.....	9
Cuadro 3. Características físicas de los medios.....	16
Cuadro 4. Medios de cultivo sólidos empleados principalmente en el laboratorio y sus características más importantes.....	16
Cuadro 5. Medios de cultivo líquidos empleados principalmente en el laboratorio y sus características más importantes.....	17
Cuadro 6. Pruebas complementarias importantes en el diagnóstico clínico de bacterias.....	18
Cuadro 7. Unidades hemoaglutinantes requeridas .....	31
Cuadro 8. Lectura de control unidades hemoaglutinantes para IA.....	32
Cuadro 9. Vías de inoculación en huevos embrionados de pollo.....	38
Cuadro 10. Casos clínicos procesados durante una semana.....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
ÁREA DE PREPARACIÓN DE MATERIAL.....	43
Figura 1. Equipo del área de lavado	
Figura 2. Solución de hipoclorito de sodio al 5%	
Figura 3. Detergente Extran	
Figura 4. Agua bidestilada	
Figura 5. Agujas y jeringas	
Figura 6. Cristalería	
Figura 7. Mortero	
ÁREA DE BACTERIOLOGÍA.....	44
Figura 8. Equipo del área de bacteriología	
Figura 9. Estructura de bacteria Gram positiva	
Figura 10. Estructura de bacteria Gram negativa	
ÁREA DE SEROLOGÍA.....	46
Figura 11. Interpretación de hemoaglutinación	
Figura 12. Interpretación de Inhibición de hemoaglutinación	
Figura 13. Titulación de virus	
Figura 14. Unidades Hemoaglutinantes	
Figura 15. Doble inmunodifusión en gel de agar	
ÁREA DE VIROLOGÍA.....	49
Figura 16. Macerado de órganos	
Figura 17. Suspensión de macerado en PBS	
Figura 18. Tubos de centrifuga con suspensión	
Figura 19. Desinfección de cascarón	
Figura 20. Perforación de cascarón	
Figura 21. Inoculación en cavidad alantoidea	
CASO CLÍNICO.....	49
Figura 22. Microscopio estereoscópico	
Figura 23. Colonias bacterianas de <i>Mycoplasma</i> spp	

## **ABREVIATURAS**

BI: Bronquitis infecciosa

CAL: Cavidad alantoidea

AIA: Anemia infecciosa aviar

SBP: Síndrome de baja postura

ELISA: Ensayo de inmunoabsorbancia ligado a una enzima (por sus siglas en inglés *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*)

ENC: Enfermedad de Newcastle

HA: Hemoaglutinación

IA: Influenza aviar

IBF: Infección de la bolsa de Fabricio

IHA: Inhibición de la hemoaglutinación

LT: Laringotraqueitis infecciosa

MCA: Membrana corioalantoidea

MG: *Mycoplasma gallisepticum*

MS: *Mycoplasma sinoviae*

NOM: Norma oficial mexicana

SAF: Solución amortiguadora de fosfatos

RPBI's: Residuos peligrosos biológico-infecciosos

SSF: Solución salina fisiológica

UHA: Unidades hemoaglutinantes

## **INTRODUCCIÓN**

El laboratorio donde se realizó el trabajo profesional, es un centro de servicios especializado 100 % mexicano, ubicado en el Distrito Federal, que brinda apoyo al diagnóstico clínico veterinario enfocado inicialmente a la avicultura, sin embargo a través de los años se ha ganado la confianza de muchas empresas pecuarias, tanto en el ramo avícola como en el mercado porcino. Cuenta con personal altamente calificado y actualizado en técnicas diagnósticas de apoyo a la industria pecuaria.

En este laboratorio se realizan pruebas de diagnóstico serológico, virológico, bacteriológico, biología molecular, histopatológico y toxicología de los alimentos.

El laboratorio apoya a instituciones educativas como la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, mediante un convenio en el cual se brinda la oportunidad de realizar el trabajo profesional de pasantes, con el objetivo de colaborar en la formación de futuros MVZ.

Se describe a continuación las actividades realizadas en las áreas de preparación y esterilización de materiales, recepción de muestras, bacteriología, serología y virología.

## **OBJETIVO GENERAL**

Al término del trabajo profesional, el alumno habrá tenido la experiencia de haber sido incorporado a la vida profesional, participando en la toma de decisiones. Así como realizar necropsias, tomar y enviar correctamente muestras para las áreas de serología, virología, bacteriología e histopatología.



## **MEDIDAS DE SEGURIDAD**

Para el ingreso al área de laboratorio, se cuenta con medidas de seguridad. Estas son un punto de partida para la protección del personal que labora dentro del laboratorio. Para lograr los fines de seguridad en el laboratorio es imprescindible que la persona que trabaja o tiene acceso a un laboratorio haya recibido capacitación profesional adecuada y haya tomado conciencia de su responsabilidad ante el manejo de agentes peligrosos, por consecuencia desarrolle una conducta prudente y al mismo tiempo pueda practicar con plena seguridad las rutinas que se realizan en un laboratorio.

Con el propósito de realizar el trabajo de la manera más segura posible, se han implementado reglas generales que continuación se mencionan (1, 2):

1. Es indispensable el uso de bata (100 % algodón) dentro del laboratorio. La bata puede ser un vehículo de contaminación por lo que se prohíbe salir del laboratorio con ella puesta.
2. Confinar el cabello largo.
3. No fumar, no comer, ni maquillarse dentro del laboratorio y en general, no llevarse objetos a la boca.
4. Se deben lavar las manos antes y después de manipular material biológico y antes de salir del laboratorio.
5. Nunca pipetear con la boca, usar siempre pipeteador automático.
6. No lavarse la piel con solventes orgánicos (cloro, alcohol, fenol, etc.) ya que predispone a infecciones e irritaciones.
7. Siempre se debe rotular el material usado en un experimento.
8. No desechar solventes al drenaje, deben neutralizarse previamente.
9. No utilizar el equipo si se desconoce su funcionamiento.
10. Descontaminar las áreas de trabajo una vez al día así como después de cualquier derrame de material biológico.

11. Seguir ordenadamente las instrucciones y protocolos para el desarrollo de una técnica o experimento.
12. Planificar el trabajo y reportarlo en una bitácora.
13. Conocer en su totalidad los señalamientos de seguridad, utensilios, botiquines y salidas de emergencia.

Dentro de un laboratorio las vías de infección en los trabajadores más frecuentes son los accidentes con objetos punzocortantes, picaduras, mordeduras de animales de experimentación, inhalación de los aerosoles durante la manipulación, contacto de membranas mucosas con material contaminado e ingestión accidental (2).

Clasificación del riesgo biológico.

La clasificación del riesgo biológico de los agentes infecciosos se basa en: su patogenicidad, su vía de transmisión, su estabilidad, la posibilidad de prevenir o tratar la infección provocada, las consecuencias epidemiológicas ligadas a éste, el tipo y complejidad de manipulaciones que se realizan con el agente biológico, etc.

De esta manera los agentes biológicos se encuentran agrupados en los siguientes niveles de riesgo biológico (1 y 2):

- Nivel 1: Agentes que presentan un riesgo de infección mínimo, tanto para el trabajador como para la comunidad. No existe enfermedad causada por ellos, o ha sido raramente descrita. Los microorganismos se clasifican como raramente patógenos. Dentro de este grupo se encuentra todo agente bacteriano, parásito, hongo o virus no incluido en los niveles de riesgos superiores.
- Nivel 2: Agentes que muestran un riesgo moderado para el trabajador. La enfermedad resulta de autoinoculaciones, ingestiones o exposiciones con membranas mucosas, o bien debido a inmunosupresión. Su diseminación

en el medio ambiente es poco probable y existen tratamientos o medidas preventivas contra la infección generada.

- Nivel 3: Agentes que producen enfermedad seria o potencialmente letal como resultado de su infección. Presenta riesgo de transmisión elevado para el trabajador, pero bajo para la comunidad.
- Nivel 4: Agentes que presentan un riesgo de infección elevado y frecuentemente mortal, tanto para el trabajador como para la comunidad. Se transmite por vía aérea. Generalmente no se dispone de tratamientos contra la infección. Actualmente no existen bacterias clasificadas dentro de este nivel, algunos ejemplos son virus.

Así pues, de acuerdo a la clasificación de los agentes patógenos, este laboratorio se encuentra clasificado dentro del nivel de riesgo biológico 1 y 2.

## **ÁREA PARA LA PREPARACIÓN DE MATERIAL USADO EN EL LABORATORIO**

Esta área de trabajo cuenta con el mobiliario y equipo (Figura 1) destinado para la esterilización, desinfección y preparación del material utilizado en las diferentes áreas, dependiendo de las pruebas o análisis que realiza el laboratorio (3).

La desinfección es un procedimiento destinado a destruir los agentes patógenos para los animales y el ser humano, que se aplica en el instrumental médico quirúrgico y de laboratorio, así como a los utensilios diversos que sean utilizados en los establecimientos y las áreas de trabajo. Se debe efectuar posterior a la limpieza (4 y 5).

La esterilización es un procedimiento que tiene por objeto la destrucción total de microorganismos, que se pueden llevar a cabo por métodos físicos o químicos. Debe ser verificado por pruebas de esterilidad apropiadas para cada caso (4 y 5).

## PROCEDIMIENTO PARA LIMPIEZA DE MATERIAL

### Material de vidrio y plástico sucios

Los materiales de cristal y algunos recipientes de plástico (excepto las cajas de petri de plástico), son sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 5 % (Figura 2), aproximadamente por 24 horas posteriormente se enjuagan cada uno detenidamente con agua corriente y se remojan en agua con detergente líquido (Figura 3) no iónico (Hyclin-Plus o Extran) por 2 a 3 horas y se lavan por dentro con escobillón, el enjuagado de cada uno se realiza detenidamente con agua corriente para eliminar los residuos de detergente, ya que pueden alterar resultados en el laboratorio y se colocan en un recipiente con agua bidestilada (Figura 4). Los materiales se colocan en las gradillas para secado (con las bocas hacia abajo), o bien se depositan en canastillas de alambre. Finalmente se prepara el material para ser esterilizado (6).

### Pipetas serológicas

Se colocan dentro de un pipetero de plástico grande con una solución desinfectante de hipoclorito de sodio durante 24 horas y se remojan en agua con detergente líquido no iónico (Hyclin-Plus o Extran) por 2 a 3 horas y se enjuagan con agua corriente. El secado de las pipetas se realiza colocándolas con la boca hacia abajo, después se les coloca en la boca de la pipeta un tapón de algodón, el cual no debe quedar muy flojo ni muy apretado y las hebras de algodón que sobresalgan del extremo de la pipeta son quemadas. Las pipetas se clasifican de acuerdo a su capacidad y son colocadas en pipeteros de metal para ser esterilizadas (6).

### Jeringas y agujas

Al término de la toma de muestra se quita el émbolo de la jeringa y ambos se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio, permaneciendo por 24 horas.

La aguja es evaluada para decidir si esta en condiciones de ser reutilizada, en caso de ser aceptada se coloca en un recipiente aproximadamente de 1 litro con hipoclorito de sodio por 24 horas; si se decide desechar se deposita en un recipiente rígido de polipropileno.

El lavado se realiza como se describió para los utensilios de vidrio y se preparan para ser esterilizadas.

## ESTERILIZACIÓN

En el laboratorio los materiales se esterilizan principalmente para:

1. La recolección de muestras, deberán estar estériles las agujas, jeringas, tubos, etc.
2. Para las distintas áreas del laboratorio y obtener resultados confiables en las pruebas o análisis realizados en el laboratorio.

En el laboratorio la esterilización se logra por medio de calor húmedo (autoclave), calor seco (horno de aire caliente) o con radiación ionizante (horno de microondas) (4 y 5).

### El Autoclave

En un recipiente cerrado se calienta agua. Esto produce una saturación de vapor a presión, con temperatura superior a 121° C. Toda clase de microorganismos mueren al calentarse los materiales durante 20 minutos a 121° C en este vapor a presión utilizando 15 libras (4 y 5). En este laboratorio usan registros de presión y temperatura de cada proceso y un programa de mantenimiento. Es recomendable controlar una vez al mes su capacidad de desinfección mediante esporas de *Bacillus stearothermophilus*.

## PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES PARA LA ESTERILIZACIÓN

Jeringas: Se coloca el émbolo dentro del cilindro hasta la mitad de éste, se enrosca la aguja tapada y de esta manera se depositan dentro de un frasco de vidrio el cual será cubierto, sólo en la boca y parte del cuello, con papel aluminio (Figura 5).

Cristalería: Se envuelven con papel aluminio la boca y parte del cuello (Figura 6).

Morteros: Se envuelven completamente con papel aluminio (Figura 7).

Recipientes de plástico: Se enrosca ligeramente su tapa sin cerrarlos completamente, para evitar que se compriman por la presión que ejerce el autoclave. Posteriormente se envuelven con papel kraft.

La esterilización adecuada del material de laboratorio es verificada por medio de cinta testigo la cual se adhiere a cada uno de los materiales, esta cinta tiene bandas claras transversales, las cuales viran a un color negro cuando el autoclave llega a la temperatura y presión indicadas anteriormente.

Procedimiento para la esterilización. Se llena con agua el fondo del autoclave, y se colocan sobre la canasta los materiales que se esterilizarán. La tapa del autoclave se cierra, cerciorándose de que las flechas externas y cada uno de los surcos de la tapa coincidan. Se atornillan simétricamente los sujetadores de la tapa con firmeza. Se abre la válvula de salida de aire y se inicia el calentamiento del autoclave. La válvula de salida de aire se cierra en el momento en que aparezca un chorro de vapor. Se deja purgar el autoclave de 3 o 4 minutos hasta que el chorro de vapor sea uniforme y continuo. Esto indicará que todo el aire se ha expulsado del autoclave y en este momento se cierra la válvula de salida de aire (6). Cuando se obtenga la presión adecuada se regula durante el tiempo que se desee esterilizar.

Cuadro 1. Tiempo ideal de esterilización	
MATERIAL	TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN
Utensilios para recolectar muestras (jeringas, tubos, etc.)	20 minutos
Recipientes contaminados	30 minutos
Medios de cultivo bacterianos	15 minutos
El material a esterilizar influye directamente en el tiempo de esterilización en el autoclave.	

### Horno de aire caliente

El procedimiento de esterilización se realiza en horno Pasteur el cual es comparable con un horno doméstico. Debe alcanzar una temperatura de 180° a 250° C durante una hora mínimo. El aire caliente circula para que cada objeto a esterilizar alcance la temperatura deseada y ésta destruya a todos los microorganismos tanto esporulados como no esporulados. El horno Pasteur es ampliamente utilizado para esterilizar material de vidrio y metal. Sin embargo no es recomendable esterilizar sustancias líquidas, telas y plásticos, ya que estos materiales tienden a deteriorarse por deshidratación e incluso pueden carbonizarse (4). La preparación del material a esterilizar se realiza del mismo modo del autoclave.

Procedimiento para la esterilización. Se introduce en el horno Pasteur todo el material a esterilizar. Se ajusta el termostato a 175° C y se enciende el horno, una vez alcanzada la temperatura de 175° C se sigue calentando durante 60 minutos más. Si los materiales son pesados o voluminosos, o si hay polvo, aceites o vaselinas, etc., se calienta a 175° C durante 2 horas más. Transcurrido el tiempo necesario apagar el horno y dejar enfriar antes de sacar el material esterilizado.

## Horno de microondas

Los hornos de microondas cada vez son más utilizados en el laboratorio y constituyen una nueva fuente de accidentes, entre los más frecuentes las explosiones cuando se usan para calentar medios con agar, ya que la diferencia de velocidad de calentamiento produce burbujas que pueden estallar (2). Se recurre a éste procedimiento para la esterilización de filtros de plástico, viales de plástico, puntas para micropipetas, microplacas, etcétera.

Procedimiento para la esterilización. Se introduce el material perfectamente seco y armado adecuadamente a una bolsa de polietileno. Colocar la bolsa dentro del horno de microondas junto con un recipiente con 500 ml de agua aproximadamente. Para asegurar una buena esterilización se realizan tres ciclos de tres minutos cambiando entre cada uno de éstos el agua empleada. Las botellas no deben cerrarse herméticamente, ya que si está cerrado estallan fácilmente.

En esta área la organización de los materiales sucios, limpios y estériles, la identificación de la etapa en la que se encuentra el lavado del material es de suma importancia, para no dejar fuera ningún paso importante en el proceso para la preparación del material utilizado en el laboratorio.

Estas actividades intervienen en forma directa en las técnicas diagnósticas del laboratorio, por tal motivo estos procesos participan en la obtención de un diagnóstico clínico confiable.

Sin lugar a dudas en esta área es necesario aplicar una adecuada separación de residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI's). Porque en esta área del laboratorio los objetos punzocortantes son depositados en un bote de plástico blanco translucido, sin identificación, con tapa de rosca, y que anteriormente



contenía detergente líquido. Ninguna de las características mencionadas anteriormente corresponde al recipiente adecuado para el depósito de los objetos punzocortantes, de acuerdo con la clasificación de los RPBI's, se recomienda colocar al menos una leyenda que indique "RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico (7).

A esta área se envía parte de la basura generada en cada una de las áreas, y no se realiza una separación adecuada, porque no se toma en cuenta el tipo de residuo que se genera. En un futuro se implementara el proceso adecuado de manejo de RPBI's, así como las normas de bioseguridad.

Cuadro 2. Separación y envasado de los residuos peligrosos biológico-infecciosos			
TIPO DE RESIDUO	ESTADO FÍSICO	ENVASADO	COLOR
Suero	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquido	Recipientes herméticos	Rojo
Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos de polipropileno	Rojo
Las distintas áreas del laboratorio deberán separar y envasar los residuos de acuerdo a sus características físicas y biológicas (7).			

## **RECEPCIÓN DE MUESTRAS**

Está área se ubica inmediatamente al acceso principal del laboratorio y separada del área especializada de trabajo (3). Cuenta con el mobiliario adecuado para la admisión y registro de muestras. La recepcionista se encarga de verificar que todas las muestras enviadas al laboratorio estén claramente identificadas y estén acompañadas de una hoja de solicitud de servicio, donde se indique nombre del cliente, teléfono, dirección, tipo de muestra, número de muestras, análisis solicitado, datos de la granja.

Una vez recibida la muestra, se anota sobre la solicitud del cliente la fecha y hora de entrada de la muestra y a partir de ese momento se tienen 8 horas para registrar el caso en el sistema, tomando en cuenta el horario de servicio del laboratorio que es de 8:00 am a 17:00 pm.

Posteriormente se revisa la muestra, buscando concordancia de la información suministrada por el cliente, con el tipo, número e identificación de la(s) muestra(s). En caso de ser rechazada la muestra se pondrá un sello de "Muestra no Apta" en la solicitud de servicio al cliente y se le notificara inmediatamente al cliente.

Una vez aceptada la muestra es registrada en el sistema de computo, el cual nos permite visualizar el resumen del caso clínico en la computadora asignada en cada área, de esta manera el Médico Veterinario Zootecnista responsable de cada área podrá revisar sus casos entrantes, pendientes y terminados. Por medio de este sistema se generan acuses de recibo de muestras, que se envían a cada uno de sus clientes por medio de fax, donde se adjunta toda la información sobre su petición de servicio al laboratorio de diagnóstico.

Los resultados son capturados por el Medico Veterinario Zootecnista responsable del área en el sistema de cómputo, posteriormente el MVZ responsable imprime y entrega los resultados personalmente a la recepcionista para finalizar el proceso de entrega de resultados. Todos los resultados de las pruebas y/o análisis realizados en el laboratorio son reportados en forma clara, exacta y sin ambigüedades.

Cada constancia de prueba contiene al menos esta información (8):

- a) Nombre y dirección del laboratorio.
- b) Identificación única de la constancia.
- c) Nombre y dirección del usuario.
- d) Descripción e identificación de la constancia.
- e) Descripción e identificación de las muestras sujetas a prueba y/o análisis.
- f) Fecha de recepción de la muestra y la fecha de realización de las pruebas o análisis.
- g) Nombre y firma del encargado de los procesos de operación y la fecha de emisión de la constancia.
- h) Declaración de que la constancia de pruebas y/o análisis sólo ampara las muestras sometidas a prueba y/o análisis.

La manera adecuada de enviar muestras representativas para el estudio solicitado, se describe a continuación:

Bacteriología. Las muestras deben mantenerse en refrigeración entre 2 y 8° C, este método permite una conservación de 24 horas, cuando el lapso de conservación es mayor se pueden utilizar cajas térmicas de polipropileno con refrigerantes de gel. El uso de hielo no esta recomendado debido a que con la descongelación existe un riesgo de contaminación de la muestra (4).

Cuando se trata de órganos las muestras deben ser tomadas de la manera más aséptica posible y almacenadas en recipientes estériles ya sean frascos de plástico, vidrio o en bolsas bien selladas (de preferencia herméticamente). Los hisopos deben ser almacenados en tubos con medio de transporte o en medios comerciales destinados a este uso (4).

En este laboratorio se le proporciona al cliente cuando éste lo solicita, tubos de centrifuga estériles con aproximadamente 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos (SAF), este medio es el ideal para enviar hisopos cloacales, los cuales son muestras adecuadas para intentar realizar un aislamiento bacteriológico de *Salmonella* spp. Se podrá hacer una mezcla de hisopos de hasta 10 aves los cuales podrán ser colocados en un solo recipiente (9).

Durante la estancia se recibieron en promedio 5 muestras para bacteriología diariamente.

Virología. Para la realización de un estudio virológico las muestras deben ser conservadas en refrigeración por espacio de 24 horas o en congelación y/o ultra congelación para tiempos más prolongados. Las muestras pueden consistir en órganos o hisopos. Los órganos deben ser tomados de la manera más asépticamente posible y depositados en un recipiente de cierre hermético como frascos de vidrio, plástico o en su defecto en bolsas de plástico selladas herméticamente (5). Se podrá hacer una mezcla de órganos de hasta 10 aves los cuales podrán ser colocados en un solo recipiente (10). Las muestras deben ser recibidas en el laboratorio en un plazo no mayor a 48 horas posteriores a su obtención.

En el caso de hisopos deben ser enviados dentro de una suspensión de caldo triptosa fosfatado o en un medio líquido como solución salina fisiológica (SSF) o SAF. Es recomendable adicionar antibiótico para evitar la contaminación bacteriana, en un volumen suficiente que permita que los hisopos permanezcan sumergidos en un medio de transporte.

Los hisopos traqueales y/o cloacales podrán ser colectados en grupos no mayores de 10 hisopos por recipiente y deben ser transportados en refrigeración. Las muestras de heces frescas deben enviarse al laboratorio dentro de un plazo máximo de 24 horas posteriores a su obtención (5, 10 y 11).

Durante la estancia se recibieron en promedio 5 muestras para virología diariamente.

Serología. Para la realización de las pruebas serológicas, las muestras deben ser colectadas y analizadas en forma individual y corresponder a por lo menos a 1 ml. Las características de los sueros deben mantener la consistencia líquida con una coloración amarilla con variaciones de tono, evitando la coloración rojiza indicativa de hemólisis, debido a que la hemoglobina contenida en los eritrocitos afecta los resultados obtenidos. No deben presentar contaminación. Se pueden utilizar frascos de vidrio, plástico, popotes bien sellados, viales de plástico, tubos de ensaye, papel filtro, etc. Estos deben conservarse en refrigeración o en congelación. Las muestras deben ser enviadas en un plazo máximo de 24 horas posteriores a su obtención.

Para ciertas pruebas se puede utilizar papel filtro impregnado con sangre, en este caso se recomienda su almacenamiento en bolsa de plástico o papel y en refrigeración evitando el contacto con la humedad (10 y 11).

Durante la estancia se recibieron en promedio 200 muestras para serología diariamente.

Histopatología. Las muestras deben encontrarse en recipientes de boca ancha y cierre hermético, conservándolos en formalina al 10 % en proporción de 10:1 (10 partes de formol por 1 de órgano). Para asegurar una buena fijación, los órganos deben ser mantenidos en formol por un lapso mínimo de 24 horas y el grosor de los cortes no debe exceder de 1 cm. Se mantiene a temperatura ambiente evitando la refrigeración y congelación. Durante la estancia se recibió en promedio 1 muestra para histopatología diariamente.

Necropsia. Las muestras consisten principalmente en aves, cuando remiten cadáveres deben ser almacenados en una bolsa de color oscuro en refrigeración, esto permite evitar el contacto con el medio ambiente y la refrigeración retarda los cambios autolíticos. Cuando se trata animales vivos, se les debe proporcionar un trato humanitario durante su transportación, así como una fuente de agua fresca, evitando aglomeraciones y mantenerlos a la sombra. Cuando su estancia es mayor a 12 horas se les debe proporcionar alimento en buen estado. No deben ser golpeados, ni maltratados durante su transportación o manejo.

Parasitología. Las muestras consisten principalmente en heces, estas deben ser almacenadas en frascos de vidrio o plástico limpios con cierre hermético, deben mantenerse en refrigeración y si es posible en dicromato de potasio al 2.5 % en una relación de 5:1, para evitar la proliferación bacteriana excesiva. Cuando se trata de ectoparásitos o endoparásitos, estos pueden ser conservados en alcohol al 70 % en un frasco de vidrio o plástico limpios de cierre hermético.

Alimentos. Cuando se requiere para un estudio toxicológico o concentración de cloruros, este debe ser almacenado en una bolsa de papel evitando la refrigeración y la humedad, para bacteriología en las mismas condiciones pero en refrigeración.

Considerando que la avicultura en nuestro país tiene un alto grado de eficiencia productiva y es un soporte en la alimentación de la población, se han establecido en el territorio nacional, con carácter obligatorio, general y permanente campañas contra enfermedades que representan un serio problema sanitario y de comercialización para la avicultura nacional. Estas son:

NOM-005-ZOO-1993 Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar.

NOM-013-ZOO-1994 Campaña Nacional contra la enfermedad de Newcastle (ENC) presentación velogénica.

NOM-044-ZOO-1995 Campaña Nacional contra la Influenza Aviar (IA).

Estas enfermedades son altamente patógenas, contagiosas y letales que afectan a las aves domésticas, causando alta morbilidad y mortalidad. Es necesaria la aplicación de estas normas para prevenir, controlar y erradicar estas enfermedades, se busca el apoyo y colaboración de todos los sectores del país que estén ligados con la avicultura nacional. Por esta razón los laboratorios autorizados por la SAGARPA, realizan las técnicas diagnósticas con base en las normas oficiales mexicanas mencionadas anteriormente.

## **ÁREA DE BACTERIOLOGIA**

Dentro del área se cuenta con el equipo (Figura 8) y mobiliario adecuado. Las pruebas para aves realizadas en esta área principalmente son: aislamiento bacteriano específico de *Salmonella* spp de acuerdo con la Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar NOM-005-ZOO-1995, rutinas bacteriológicas generalmente con antibiograma y la técnica de Gentry para huevo, que posteriormente serán descritas.

### **Medios de cultivo**

La mayoría de las bacterias, además de crecer en su hábitat natural, pueden ser cultivadas *in vitro* en medios artificiales, exhibiendo una gran variedad de requerimientos nutritivos dependiendo del género y la especie (4).

Las sustancias nutritivas comúnmente incorporadas a los medios de cultivo son: extracto de carne, peptonas y carbohidratos. Los medios de cultivo sólidos incluyen en su fórmula factores solidificantes como el agar que funde a 90° C y permanece líquido hasta una temperatura de 40° C. En la actualidad, los laboratorios de bacteriología tienen a su disposición medios de cultivo deshidratados y disponibles comercialmente, lo cual representa una gran ventaja sobre el método convencional de preparación a partir de sus ingredientes, ya que

se tienen lotes completos de un determinado medio preparado en forma uniforme y bajo condiciones controladas (12).

Cuadro 3. Características físicas de los medios (4,12)				
MEDIOS	CONTENIDO DE AGAR	METODO DE SIEMBRA	CRECIMIENTO	UTILIDAD
Líquido	No contiene agar	Siembra por agitación	Turbidez del medio	Promueve crecimiento bacteriano Diluye efectos tóxicos
Semisólido	0.5 - 0.75 %	Siembra por picadura	Turbidez en sitio de inoculación	Motilidad bacteriana Conservar cepas
Sólidos	1.5 %	Siembra en cultivo puro Siembra en estría cerrada	Aislamiento de colonias bacterianas	Aislamiento de colonias bacterianas Pruebas de susceptibilidad bacteriana
Duros	3 %			Disminuir crecimiento invasivo de bacterias

Los requerimientos nutricionales de las bacterias y hongos son muy variados, lo cual hace necesario contar con una amplia gama de estos medios de cultivo.

Cuadro 4. Medios de cultivo sólidos empleados principalmente en el laboratorio y sus características más importantes (4 y 12).			
NOMBRE	SIGLAS	CARACTERÍSTICAS	COLONIAS
Base Agar Sangre	BSA/AS	Es un medio sólido, enriquecido, donde crecen todo tipo de bacterias. pH: 7.3 ±0.2	Se aprecian colonias: Alfa: producción de un halo de color gris verdoso alrededor de las colonias (hemólisis incompleta). Beta: producción de un halo transparente alrededor de las colonias, se interpreta como hemólisis completa.
Agar Soya Trypticaseína	TSA	Es un medio sólido básico, donde crece todo tipo de bacterias. pH: 7.3 ±0.2	Provoca crecimiento de bacterias que no se pueden distinguir hasta aplicar otras técnicas.
Agar Müller Hinton	MHA	Es un medio general, donde crece todo tipo de bacterias que no sean exigentes en sus requerimientos. pH: 7.3 ±0.2	Se emplea para pruebas de susceptibilidad antibacteriana, donde se utilizan sensibilizadores y se mide el halo de inhibición bacteriana.



Cuadro 4. Medios de cultivo sólidos empleados principalmente en el laboratorio y sus características más importantes (4 y 12).

NOMBRE	SIGLAS	CARACTERÍSTICAS	COLONIAS
Manitol Sal Agar	MSA	Es un medio selectivo diferencial, para <i>Staphylococcus</i> . pH: 7.4 ±0.2	Se pueden observar bacterias que fermentan o no el manitol.  Manitol (+): el medio se torna amarillo. Manitol (-): no hay variación del color del medio o se alcaliniza el medio.
Agar MacConkey	MCA	Es un medio selectivo diferencial, favorece al crecimiento de enterobacterias. pH: 7.1 ±0.2	El sustrato de reacción es la lactosa. Lactosa positivas: el medio y las colonias se tornan color rosa. Lactosa negativas: las colonias son incoloras o del color del medio.
Agar verde brillante	VBA	Medio selectivo para el aislamiento del género <i>Salmonella</i> principalmente. pH: 6.9 ±0.2	El sustrato de reacción es la lactosa. Lactosa positiva: son colonias amarillas o verdosas. Lactosa negativa: colonias de color fucsia, rojas o rosas.
Agar Dextrosa Sabouraud	DSA	Es general para favorece el crecimiento de hongos. pH: 5.6±0.2	Crece todo tipo de hongos.

Cuadro 5. Medios de cultivo líquidos empleados principalmente en el laboratorio y sus características más importantes (4 y 12).

NOMBRE	SIGLAS	CARACTERÍSTICAS
Caldo infusión cerebro corazón	BHI	Son medios enriquecidos para bacterias exigentes; tanto aerobias como anaerobias. pH: 7.4
Caldo tetrionato	TEC	Son medios de enriquecimiento que tienen efecto inhibitorio sobre algunos géneros bacterianos favoreciendo el desarrollo de otros que se encuentran en menos proporción en la muestra.
Caldo selenito cistina	SEC	Son medios selectivos, para aislar principalmente organismos anaerobios. pH: 7.4

Cuadro 6. Pruebas complementarias importantes en el diagnóstico clínico de bacterias (4 y 13).

PRUEBA	PRINCIPIO	MÉTODO	UTILIZACIÓN MÁS FRECUENTE
Catalasa	La enzima descompone el peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Añadir 1 gota de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a un cultivo denso y buscar burbujas O <sub>2</sub>	<i>Bacillus</i> (+) <i>Clostridium</i> (-) <i>Micrococcus</i> (-) <i>Staphylococcus</i> (+)
Citrato	La utilización del citrato como única fuente de carbono produce la alcalinización del medio	Un medio de citrato con azul de bromotolol como indicador de pH. Buscar un color azul (pH alcalino)	<i>Enterobacter</i> (+) <i>Escherichia</i> (-) <i>Edwardsiella</i> (-) <i>Salmonella</i> (+)
Descarboxilasas (lisina, ornitina, arginina)	La descarboxilación de los aminoácidos libera CO <sub>2</sub> y amina	Medio enriquecido con aminoácidos. El púrpura de bromocresol como indicador de pH vira a púrpura (pH alcalino) sino actúa la enzima	Ayuda en la determinación del grupo bacteriano entre las enterobacterias
Prueba de la β-galactosida (ONPG)	El ortonitrofenil-β-galactósido (ONPG) es un sustrato artificial para la enzima. Cuando se hidroliza, se forma el nitrofenol (amarillo). Lactosa (+) tardías	Incubar una suspensión pesada de un cultivo lisado con ONPG. Buscar un color amarillo	<i>Citrobacter</i> y <i>Arizona</i> (+) <i>Salmonella</i> (-) Identificación de algunas especies de <i>Shigella</i> y <i>Pseudomonas</i>
Licuefacción de la gelatina	Muchas hidrolasas hidrolizan la gelatina y destruyen el gel	Incubar un caldo con 12 % de gelatina. Enfriar para comprobar la formación del gel. Si se hidroliza la gelatina, el tubo permanece líquido cuando se refrigera	Ayudar en la identificación de <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i>
Producción de sulfuro de hidrógeno	La producción de H <sub>2</sub> S por rotura de aminoácidos azufrados o reducción de tiosulfato	El H <sub>2</sub> S se detecta en un medio rico de hierro a partir de la formación de sulfito ferroso negro (variantes: agar hierro triple azúcar también detecta la fermentación de hidratos de carbono)	En enterobacterias, ayuda a la identificación de <i>Salmonella</i> , <i>Arizona</i> , <i>Edwardsiella</i> y <i>Proteus</i>
Prueba de indol	Conversión del triptófano de las proteínas de indol	Detección del indol en el medio de cultivo con dimetilaminobenzaldehído (color rojo)	Distinguir <i>Escherichia</i> (+) de <i>Klebsiella</i> (-) y <i>Enterobacter</i> (-); <i>Edwardsiella</i> (+) de <i>Salmonella</i> (-)

Cuadro 6. Pruebas complementarias importantes en el diagnóstico clínico de bacterias (4 y 13).

PRUEBA	PRINCIPIO	MÉTODO	UTILIZACIÓN MÁS FRECUENTE
Prueba de rojo de metilo	Los fermentadores mixtos de ácidos producen suficiente ácido para disminuir el pH por debajo de 4,3	Caldo de glucosa. Después de la incubación, añadir indicador rojo de metilo a la muestra	Diferenciar <i>Escherichia</i> (+, cultivo rojo) de <i>Enterobacter</i> y <i>Klebsiella</i> (generalmente -, cultivo amarillo)
Reducción de nitratos	El nitrato como un aceptor electrónico alternativo, reducido a $\text{NO}_2^-$ o $\text{N}_2$	Caldo con nitrato. Tras la incubación detectar nitrito con ácido $\alpha$ -naftilamina sulfanílico (color rojo). Si es negativo confirmar que el $\text{NO}_3^-$ está aún presente añadiendo polvo de zinc para reducir el $\text{NO}_3^-$ a $\text{NO}_2^-$ . Si tras la adición de zinc no hay color, entonces $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	Ayudar a la identificación de enterobacterias (generalmente +)
Prueba de oxidasa	El citocromo c oxida el aceptor de electrones artificial: tetrametil (o dimetil)-p-fenilendiamina	Caldo o agar. Las colonias oxidasa positivas en agar pueden detectarse sumergiendo la placa en un reactivo y buscando colonias azuladas o marrones	Separar enterobacterias (todas -) de <i>Pseudomonas</i> (+). Ayuda en la identificación de <i>Aeromonas</i> (+)
Prueba de la oxidación – fermentación (O/F)	Algunos organismos producen ácido o solamente cuando crecen en aerobiosis	Producción de ácido en la parte alta del tubo de cultivo que contiene azúcar; el agar blando se utiliza para disminuir la mezcla durante la incubación	Diferenciar <i>Micrococcus</i> (producción de ácido solo en aerobiosis) de <i>Staphylococcus</i> (producción anaeróbica de ácido). Caracterizar <i>Pseudomonas</i> (producción aeróbica de ácido) de enterobacterias (producción anaeróbica de ácido)
Urea	La urea $\text{HN-CO-NH}_2$ se escinde en $2 \text{NH}_3 + \text{CO}_2$	Medio con 2 % de urea y rojo de fenol como indicador. La liberación de amonio eleva el pH, intenso color rojo rosado	Distinguir <i>Klebsiella</i> (+) de <i>Escherichia</i> (-). Distinguir <i>Proteus</i> (+) de <i>Providencia</i> (-)
Prueba de Voges-Proskauer	La acetoina es producida a partir de la fermentación de azúcares	Prueba química para acetoina utilizando $\alpha$ -naftol	Distinguir <i>Klebsiella</i> (+) y <i>Enterobacter</i> (+) de <i>Escherichia</i> (-).

Los factores fisicoquímicos son importantes y es necesario su control porque afectan el crecimiento de bacterias, entre estos se encuentran la temperatura; la mayoría de las bacterias patógenas se encuentran en el rango de las mesófilas. El pH porque la mayoría de las bacterias patógenas crecen mejor en un pH de 6.0 a 8.0. La humedad relativa de 70 a 80 %; la cual es óptima para la mayoría de bacterias. La atmósfera, controlada según sus requerimientos de oxígeno de las distintas bacterias.

La descripción de las colonias bacterianas se realiza cuando éstas se encuentran separadas unas de otras en el medio de cultivo, tomando en cuenta las siguientes características: tiempo de crecimiento, tamaño, color, superficie, borde, pigmentación, opacidad, elevación, hemólisis y estructura interna. No siempre será necesario detallar todas las características morfológicas, generalmente se detallan las más relevantes (4).

Las características de superficie, borde, opacidad, elevación y estructura interna, están sujetas a la interpretación subjetiva del observador. Para describirlas es necesario el uso del microscopio estereoscópico, por lo que su valor descriptivo es menos relevante (4).

La visualización del agente patógeno o su efecto en el material biológico remitido al laboratorio de diagnóstico constituyen el primer paso hacia su identificación. Esto puede realizarse mediante un examen directo de un frotis fijo teñido con colorantes específicos (4).

Método de preparación para un frotis fijo. Un portaobjetos limpio y libre de grasa se identifica en el extremo superior con el número del caso clínico correspondiente, esto se realiza con un plumón indeleble, así también se señala por medio de un ovalo el lugar donde se hará la extensión. Sobre el portaobjetos, en la cara contraria del ovalo señalado, se colocan 3 gotas pequeñas de agua

destilada con el asa bacteriológica, posteriormente se flamea el asa y se toma una colonia del medio de cultivo, no debe tomarse una cantidad muy grande pues, en caso contrario, el frotis resultaría muy grueso y no podría estudiarse adecuadamente. La colonia es mezclada con las gotas de agua y posteriormente extendida sobre el portaobjetos. Ya que se seco, se fija pasando el portaobjetos 3 veces por el fuego.

### Tinción de Gram

Esta tinción consiste en teñir la extensión bacteriana con violeta de genciana, someterla a la acción mordente del yodo; al combinarse los componentes de la célula bacteriana y el colorante, éste es retenido por la pared celular. Posteriormente se tratan con alcohol acetona, hasta eliminar el exceso de colorante, la pared de las bacterias Gram positivas (Figura 9) sufre una deshidratación que impide la salida del colorante. En caso de las Gram negativas (Figura 10), el agente decolorante destruye la integridad de la membrana externa, incrementando así su permeabilidad, lo cual permite la salida del colorante primario. En consecuencia la fucsina básica o safranina, que participa como colorante de contraste, es incapaz de penetrar en la pared del primer grupo, mientras que si es incorporada en la pared del segundo grupo mencionado. Por lo tanto los microorganismos que conserven el cristal violeta son Gram positivos y se observaran de color azul o morado y los que no lo hacen serán Gram negativos y se observaran de color rosa o rojo que corresponde al de la safranina o fucsina (4, 12, 14 y 15).

Procedimiento para la Tinción de Gram. El proceso de la tinción de Gram es distinto en este laboratorio; principalmente en el tiempo de acción de los colorantes, además no emplean la solución de bicarbonato de sodio como catalizador. El frotis se cubre con cristal violeta (colorante primario) y se deja actuar por 1 minuto. Posteriormente se lava con agua corriente. Se aplica el yodo y se deja actuar por 1 minuto. Posteriormente se lava con agua corriente.

Se aplican algunas gotas de alcohol-acetona hasta eliminar el exceso del colorante primario. Posteriormente se lava con agua corriente. Se cubre con fucsina básica (colorante de contraste) y se deja actuar por 1 minuto. Posteriormente se lava con agua corriente. Se deja secar a temperatura ambiente. Se coloca una gota de aceite de inmersión y se observa al microscopio con el objetivo 100X.

El primer paso en la identificación bacteriana consiste en la determinación de las características generales de los microorganismos problema. En las bacterias se utilizan los criterios de morfología microscópica, agrupación y reacción tintorial.

Una vez determinadas estas características se deben consultar esquemas, cuadros o tablas de identificación, los cuales nos conducen al conocimiento del género y en lo posible a la especie bacteriana. Dentro de los diversos sistemas que pueden ser utilizados para la identificación existen los que están basados en pruebas bioquímicas. En estas pruebas se ponen de manifiesto reacciones metabólicas sobre sustratos conocidos.

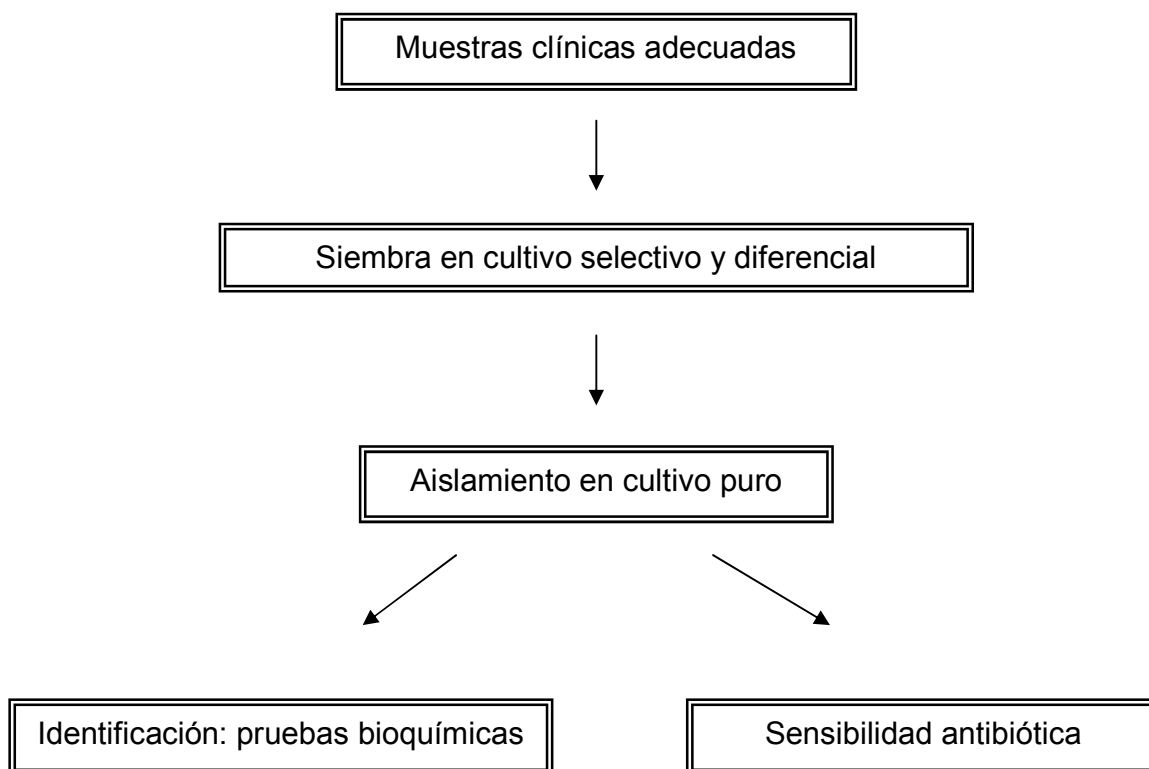
#### Procesamiento de las muestras

Al llegar las muestras al laboratorio, se evalúan las condiciones de toma de las mismas, ya que aquellas muestras que no hayan sido colectadas y enviadas correctamente no deben ser procesadas, pues los resultados que se obtengan no serán confiables. Por otro lado, las muestras en buenas condiciones son preparadas para ser procesadas, de acuerdo a la prueba solicitada.

## Aislamiento microbiológico convencional

Los medios de cultivo empleados en este laboratorio para el aislamiento microbiológico son medios de cultivo selectivos como agar verde brillante, medios enriquecidos como el agar sangre, medios diferenciales como el CHROMagar orientador.

Método diagnóstico empleado en el aislamiento e identificación de bacterias



### Aislamiento e identificación de *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*

Los medios requeridos para el aislamiento son: caldo tetracionato con solución yodurada o caldo selenito, agar verde brillante. Si se requiere realizar pruebas complementarias se emplean medios para bioquímicas como son: SIM, TSI, citrato de Simmon, LIA, urea. Además medios para bioquímica complementarios como son: caldo malonato, dulcitol, glucosa con tubo Durham, lactosa, maltosa (9).

Preparación y acondicionamiento de la muestra. Las muestras de hígado, bazo, vesícula biliar, ovarios, testículos, tonsilas cecales, páncreas, medula ósea, saco vitelino y embriones no requieren de un tratamiento específico antes de su análisis, sólo su conservación en refrigeración en frascos o bolsas estériles de polietileno no más de 24 horas (4 y 9).

Los hisopos cloacales y/o hisopos con heces frescas se deben enviar en recipientes estériles, herméticamente cerrados, deben contener agua peptonada o cualquier otro medio de transporte adecuado y deben conservarse en refrigeración no más de 48 horas y éstas deben venir con historia clínica completa, con las fechas de toma de muestra y envié al laboratorio (4,9).

Procedimiento. Se coloca la muestra dentro de un frasco de 10 ml y se le agrega el caldo de enriquecimiento en una proporción de 1:10 (muestra caldo). Se incuba a 37° C por 24 horas. Transcurrido este tiempo se siembra a partir del medio líquido enriquecido, en agar verde brillante y se utiliza preferentemente la técnica de aislamiento en cultivo puro. Se incuban a 37° C por 24 horas. Después de este tiempo se realiza la lectura de los medios sólidos, donde se espera hallar crecimiento bacteriano el cual promoverá en el medio de cultivo un cambio de color; el color rosa indica que la bacteria no fermenta la lactosa (Lactosa negativa) y el color amarillo indica que la bacteria fermenta la lactosa (Lactosa positiva).



La *Salmonella pullorum* o *Salmonella gallinarum* son lactosas negativas por lo tanto se espera hallar el medio de cultivo de color rosa. Aún cuando el resultado sea negativo a *Salmonella* spp se resiembran medios de cultivo selectivos a las 48 y 72 horas a partir del caldo enriquecido, antes de ser desechado éste (9).

Se considera negativo el resultado cuando después de sembrar a las 24, 48 y 72 horas no hay crecimiento de colonias sospechosas de *Salmonella* spp (9). Sin embargo, si se presenta crecimiento de bacterias lactosa negativa, se realiza el aislamiento en cultivo puro y así poder establecer el tipo de pruebas de identificación que se requerirán. La identificación se basa en la determinación del género y la especie del microorganismo aislado y puede realizarse mediante el uso de pruebas bioquímicas. A partir de este aislamiento se puede realizar la prueba de susceptibilidad a quimioterapeúticos.

Prueba de sensibilidad a quimioterapeúticos.

Después de realizar un aislamiento en cultivo puro se puede medir fácilmente la sensibilidad de un cultivo por medio de la difusión en agar (13). Se toma con un asa una colonia de la placa de agar y se inocula en tubo con 5 ml de SSF, se homogeniza hasta tener una densidad óptica de 0.5 de acuerdo a la suspensión de Mc Farland. Posteriormente se sumerge un hisopo estéril en el cultivo líquido y con éste se inocula una placa de agar Müller Hinton en estría cerrada o siembra masiva. Sobre la placa de agar se colocan discos de papel filtro con una concentración conocida de distintos antimicrobianos (4, 13). Entre los discos debe existir una separación mínima de 2 cm, y tras la incubación de 24 horas a 37 °C se realiza la anotación de las zonas de inhibición, midiendo los tamaños (diámetro) de las zonas de inhibición en milímetros (mm.). En el laboratorio un microorganismo se considera sensible con una zona de inhibición mayor a 17 mm. Estos informes, denominados antibiogramas, indican la sensibilidad de los organismos aislados clínicamente a los antibióticos de uso actual (13).

## Técnica de Gentry

Los medios de cultivo requeridos para el estudio son: TSA, agar Mac Conkey, agar Sal y Manitol, agar dextrosa Sabouraud. Cuando se requiere realizar pruebas complementarias se emplean medios para bioquímica como son: SIM, TSI, citrato de Simmon, LIA, urea.

Las muestras generalmente son enviadas en 5 grupos de 5 embriones cada uno y esta es razón por la cual las muestras son trabajadas en grupo, principalmente el usuario requiere verificar la sanitización llevada a cabo en los embriones.

Preparación y acondicionamiento de la muestra. Los embriones no requieren de un tratamiento específico antes de su análisis, sólo su conservación en refrigeración en bolsas estériles de polietileno no más de 24 horas.

Procedimiento para el estudio externo. Cada grupo de 5 embriones es bañado con 9 ml de SSF estéril, a continuación cada uno de los embriones es enjuagado y frotado con las paredes internas de la bolsa y depositado en moldes de plástico especial para huevos. Este proceso es llevado a cabo para suspender en el líquido el material adherido en el cascarón. Posteriormente sólo el líquido es vertido en tubos de ensayo estériles. Se realiza este proceso con cada uno de los grupos. Posteriormente se toma con el asa microbiológica de 1  $\mu$ l de este líquido y se siembra en los medios de cultivo previamente identificados por clave y por estudio. La incubación se realiza a 37° C y se realiza lectura a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Procedimiento para el estudio interno. Se realiza el estudio de saco vitelino y líquido alantoideo a los embriones que se les realizó el estudio externo. Cada grupo de 5 embriones es bañado con alcohol al 70 %, a continuación cada uno de los embriones es perforado por la cámara de aire, con tijeras desinfectadas, se retira la fáfara y con un hisopo estéril se toma la muestra de saco vitelino y líquido alantoideo en cada uno de los embriones que componen un grupo. Posteriormente

con este hisopo se hace la siembra en los medios de cultivo previamente identificados por clave y por estudio. Se realiza este proceso con cada uno de los grupos. La incubación se realiza a 37° C y se realiza lectura a las 24, 48, 72 y 96 horas.

## **ÁREA DE SEROLOGÍA**

Las pruebas para aves realizadas en esta área principalmente son: Inhibición de la hemoaglutinación (IHA) para la Enfermedad de Newcastle (ENC) e Influenza aviar (IA) de acuerdo con las normas oficiales mexicanas implementadas para estas enfermedades, ensayo de inmunoabsorbancia ligado a una enzima (ELISA) y la prueba Precipitación en gel de agar que posteriormente serán descritas.

Con las pruebas serológicas los anticuerpos son medidos por medio de una reacción producida en la dilución de la muestra en un sistema de ensayos. A esta dilución se le llama "título" de la muestra. Si una muestra presenta un título de 32 contiene la mitad de anticuerpos que una muestra con un título de 64 y contiene el doble de una muestra con un título de 16. El título de una muestra refleja la sensibilidad de la prueba.

La determinación de anticuerpos circulantes se utiliza en:

1. Determinación de la respuesta posvacunal y su relación con la protección contra microorganismos específicos potencialmente patógenos
2. Monitoreo sobre la incidencia de microorganismos específicos en parvadas de una empresa o en una región avícola
3. Monitoreo en parvadas reproductoras o progenitoras para evaluar un programa de erradicación de agentes patógenos
4. Investigación y monitoreo de brotes infecciosos

## Hemoaglutinación viral

La hemoaglutinación (HA) se observa a simple vista ya que los eritrocitos se conglomeran, esta prueba puede realizarse sobre un portaobjetos o una microplaca. Este fenómeno se presenta porque los receptores de superficie de los glóbulos rojos se unen a proteínas externas en el virus hemoaglutinante.

Las características principales de esta prueba son la rapidez, el bajo costo de los reactivos y la sencillez de su realización, esto determina su fácil adaptación a los laboratorios. Sin embargo la prueba no es muy sensible para detectar una pequeña concentración del virus. Esta prueba es el primer paso para la identificación de un virus aislado pues permite determinar la presencia de virus hemoaglutinantes en el líquido infectado, además de titular partículas virales, activas o inactivas en una suspensión y permite purificar y concentrar virus.

La interpretación de la prueba se describe a continuación:

En la reacción positiva (Figura 11), se observa la formación de un depósito de glóbulos rojos uniformemente aglutinados cubriendo todo el fondo de la microplaca y en la reacción negativa se observa la formación de un sedimento compacto, en forma de botón y límites precisos en el centro del fondo del tubo.

## Inhibición de la Hemoaglutinación viral

La prueba de la inhibición de la hemoaglutinación (IHA) viral consiste en la unión de anticuerpos específicos a la hemoaglutinina del virus, impidiendo así la unión de los receptores de los glóbulos rojos y la hemoaglutinina del virus. Esta es una prueba altamente específica y sensible.

Existen dos métodos para realizar esta prueba:

- Método alfa. Se realizan diluciones decrecientes de virus y se enfrentan a cantidades constantes de suero.
- Método beta. Se realizan diluciones decrecientes del suero y se enfrentan a cantidades constantes de virus.

Esta prueba se realiza para identificar virus, determinar la relación antigénica entre virus aislados e identificación y cuantificación de anticuerpos contra un virus.

El método beta es el más utilizado en el laboratorio y las unidades hemoaglutinantes utilizadas son variables de acuerdo a la prueba. La interpretación de la prueba de IHA (Figura 12) método beta, se realiza por medio del título de inhibición del suero y esta dado por el inverso de la dilución más alta del suero capaz de inhibir al 100 % la hemoaglutinación.

Factores que intervienen en la HA e IHA viral

Los virus varían en su actividad hemoaglutinante debido a las diferentes cepas, la concentración viral, el número de pases y el sistema huésped de propagación.

Los glóbulos rojos pueden no ser adecuados debido a diferencias individuales del donador, la especie, la edad y sexo. Así como el tiempo de almacenamiento de los glóbulos rojos. Los eritrocitos pueden aglutinar por sí solos, por esta razón utilizamos durante la prueba un testigo de glóbulos rojos y las condiciones de la prueba varían de un virus a otro tomando en cuenta la temperatura y el tiempo de incubación de la reacción, el pH y la concentración de ciertos cationes en el diluyente (5).

En este laboratorio una de las pruebas diagnósticas más utilizadas para aves es la Inhibición de hemoaglutinación (IHA) para IA, ENC, Síndrome de baja postura (SBP), *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma sinoviae* (MS), y Bronquitis Infecciosa (BI), en mucha menor proporción. La prueba de IHA para IA se realiza con base en la Norma 044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza aviar, a continuación descrita.

En primer lugar se realiza la titulación del virus. La técnica utilizada para la titulación es la HA. El objetivo de esta técnica es detectar y cuantificar la presencia de virus hemoaglutinantes aislados y propagados en huevos embrionados o en cultivos celulares.

La titulación del virus (Figura 13) se realiza en dilución doble seriada iniciando en 1:2 y 1:5; para obtener mayor confiabilidad se realiza por triplicado cada una de las diluciones en una microplaca en fondo en "U" de 96 pozos. Se deposita en cada uno de los 12 pozos de las 6 primeras filas 25  $\mu$ l de SAF, y únicamente en los primeros pozos de la dilución 1:5 se agregan 80  $\mu$ l de SAF. Después se le agregan 25  $\mu$ l del antígeno a titular, únicamente a los primeros pozos correspondientes a la dilución 1:2 y 20  $\mu$ l en los pozos correspondientes a la dilución 1:5, a continuación se homogeniza con una pipeta multicanal y se realizan las diluciones correspondientes (de 1:2 a 1: 4098 y 1:5 a 1:10240). Posteriormente se agregan 25  $\mu$ l de SAF en todos los pozos, y al final se agregan 50  $\mu$ l de una suspensión de glóbulos rojos al 1 %. En una hilera contigua se realiza un control de glóbulos rojos; se depositan 50  $\mu$ l de SAF y 25  $\mu$ l de glóbulos rojos al 1 %. Se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos. En la lectura el punto final de la titulación será en la dilución más alta del antígeno en la que se observe el 100 % de hemoaglutinación. Este número nos indica la cantidad de unidades hemoaglutinantes (UHA) que contiene nuestro antígeno.

Después de saber el título de las UHA contenidas en el antígeno, se realiza una dilución para obtener una concentración definida de UHA. Esto depende de las UHA requeridas en la prueba a realizar (Figura 14).

Cuadro 7. Unidades Hemoaglutinantes requeridas

Enfermedad	UHA
ENC	10
EDS	8
IA	4
BI	4
MG, MS	4

La IHA se estandarizo con distintas UHA de acuerdo a cada enfermedad.

El volumen de dilución del antígeno se obtiene a partir del número de sueros a trabajar. (En cada microplaca se realizan diluciones para 8 sueros).

El segundo paso antes de realizar la prueba de IHA, es realizar un control de UHA. Éste se realiza utilizando la técnica de HA a partir del antígeno diluido para comprobar que la dilución contenga las UHA requeridas en la prueba. De igual manera para aumentar la confiabilidad de la prueba, ésta se realiza por triplicado. Se agregan 25 µl de SAF en las tres primeras filas verticales de la microplaca (de A-H), posteriormente se agrega el antígeno diluido únicamente en los 2 primeros filas verticales (A y B), con la micropipeta multicanal se realizan las diluciones correspondientes a partir del segundo pozo (B) y se agregan 25 µl de SAF y por último la suspensión de glóbulos rojos al 1 %. En una hilera contigua se realiza el control de glóbulos rojos; se depositan 50 µl de SAF y 25 µl de glóbulos rojos al 1 %. Se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos. Si la dilución del antígeno para obtener 4 UHA fue la correcta se observara HA hasta la dilución 1:4.

Cuadro 8. Lectura de control de Unidades Hemoaglutinantes para IA

POZO	DILUCIÓN	INTERPRETACIÓN	No. UHA
A1	Ag diluido	La dilución del Ag debe contener 4 UHA	4
A2	1:2	1ª dilución contiene el 50 % UHA	2
A3	1:4	2ª dilución contiene el 25 % de UHA	1
A4	1:8	3ª dilución contiene el 12.5 % UHA	0.5
A5	1:16	4ª dilución contiene el 6.25 % de UHA	0.25
A6	1:32	5ª dilución contiene el 3.12 % de UHA	0.125
A7	1:64	6ª dilución contiene el 1.56 % de UHA	0.062
A8	1:128	7ª dilución contiene el 0.78 % de UHA	0.031

Ahora se tiene el antígeno con 4 UHA, se realiza la prueba de IHA para IA. Esta prueba se realiza en microplacas de fondo en “V”, en dilución doble seriada iniciando 1:2 hasta 1:32, es decir sólo se emplean 5 pozos, porque únicamente se buscan los sueros negativos o positivos a la presencia de anticuerpos contra IA (un título mayor a 1:16 será positivo). A cada pozo se le agrega 25 µl de SAF, posteriormente se agrega la muestra problema la cual será diluida en los pozos contiguos y al finalizar se desecharán 25 µl, después se agrega el antígeno anteriormente preparado, se homogeniza la placa y se deja incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de la reacción se agregan 25 µl de suspensión de glóbulos rojos al 1 % y se deja incubando a temperatura ambiente por 30 minutos. Al realizar la lectura de esta prueba se observaran en los sueros positivos la formación de un botón de glóbulos rojos de forma circular con bordes definidos que se desliza tomando la forma de una gota en el fondo del pozo, al inclinar la microplaca en un ángulo de 45°. En los sueros negativos los glóbulos rojos sedimentan formando una capa uniforme en el fondo del pozo (11).



## Ensayo de inmunoabsorbancia ligado a una enzima (ELISA)

En las técnicas inmunoenzimáticas, por ejemplo ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) se utilizan conjugados antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, llamados conjugados que tienen actividad enzimática. Los antígenos o anticuerpos están fijados en una superficie y los componentes marcados con una enzima se unen en un complejo antígeno-anticuerpo quedando inmovilizado, este complejo podrá ser revelado con la adición de un sustrato específico que al actuar con la enzima, producirá un color observable a simple vista y cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

En la prueba de ELISA se han utilizado diferentes tipos de materiales para fijar antígenos o anticuerpos como polivinil, polipropileno o poliestireno que es el más práctico y económico.

La técnica ELISA es versátil, simple en su realización y emplean reactivos económicos. Para realizar la prueba se necesita una placa sensibilizada, es decir un antígeno a anticuerpo adherido a la placa, diluido en buffer de carbonato/bicarbonato con un pH de 9.8. Una vez adherido el antígeno o el anticuerpo, se lava con SAF-tween para eliminar el exceso de los reactivos después de cada período de incubación y se adiciona albúmina sérica bovina para bloquear los sitios libres. La placa debe lavarse al menos 3 veces y escurrirla entre cada paso de la técnica. Aunque la prueba es muy específica, debe evitarse la utilización de sueros hemolisados o contaminados, ya que estos pueden interferir con los resultados de la prueba.

Existe una gran variedad de enzimas para marcar, estas deben ser estables en condiciones libres o conjugadas, altamente reactivas, puras y económicas.

Las enzimas comúnmente utilizadas en los paquetes comerciales son la acetil colinesterasa y la peroxidasa de rábano.

Los cromógenos deben ser solubles, económicos, seguros y de fácil manejo, los más utilizados son el ABTS (Sal diamino del ácido 2,2-azino-di(3 etil benzotiazolinsulfónico-6)) y TMB (3,3',5'-tetrametilbenzidina) (1).

Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pozos de la placa ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda. Son la que se corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados. Actualmente se están desarrollando dispositivos de mayor capacidad, por ejemplo con 384 y 1536 pocillos, adecuados para los sistemas de 'screening' masivo de los sistemas robotizados (HTS, 'High-throughput system').

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución, o la determinación de la subclase de un anticuerpo. A continuación se describen los más empleados en el laboratorio.

ELISA indirecto. Las placas ELISA se preparan de una forma idéntica a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno, y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpo secundarios por cada primario (1).

ELISA competitivo. Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después se agrega la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el

material no retenido se aplica una solución con un antígeno marcado. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo antígeno, que nos indicara la presencia o ausencia del antígeno en la muestra.

En el laboratorio la prueba diagnóstica de ELISA indirecta se utiliza principalmente para las siguientes enfermedades presentes en aves: BI, Infección de la bolsa de Fabricio (IBF), Anemia infecciosa aviar (AIA), Laringotraqueitis infecciosa (LT), IA, ENC, EDS, MG, MS en mucha menor proporción. La prueba de ELISA competitiva se realiza para detectar la presencia de toxinas en el alimento, algunos ejemplos de toxinas son: Aflatoxinas, Toxina T-2, Ocratoxina, Zearelanona, Vomitoxina y Fumonisina.

#### Reacción de precipitación en un medio semisólido

En las pruebas de precipitación en medios semisólidos no se requiere titular el antígeno o el suero previamente ya que la proporción adecuada de estos elementos se producirá al difundirse ambos en el agar. Estas pruebas tienen la gran ventaja de que permiten identificar varios antígenos o sueros sospechosos a la vez en una sola prueba.

Esta prueba es fácil en su realización y proporciona una idea del estado inmunológico de un grupo de animales. Sin embargo presenta una baja sensibilidad porque para obtener una reacción positiva es necesaria la presencia de concentraciones altas de anticuerpos.

En el agar solidificado se realizan pozos con un sacabocados en los que se colocan estratégicamente el antígeno y los antisueros. Se incuba durante 24 a 48 horas dentro de una caja de poliuretano con papel absorbente húmedo.

La difusión de un antígeno y un anticuerpo homólogos a través del agar formarán líneas del precipitado. La calidad y forma de las bandas de precipitación representan la pureza, especificidad, tamaño molecular y concentración del complejo antígeno-anticuerpo. El número de estas líneas corresponderá a los diferentes complejos antígeno-anticuerpo existentes (Figura 15).

En este laboratorio prueba de precipitación en agar, se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra el agente causal de Hepatitis con cuerpos de inclusión presente en aves (1).

## **ÁREA DE VIROLOGÍA**

La prueba realizada en esta área principalmente es el aislamiento viral para la Enfermedad de Newcastle (ENC) e Influenza aviar (IA) de acuerdo con las normas oficiales mexicanas, así como BI, Laringotraqueitis infecciosa (LTI), Viruela Aviar (VA), Infección de la bolsa de Fabricio (IBF). La técnica posteriormente será descrita.

Dado que los virus sólo se replican en el interior de células vivas, para su estudio y aislamiento se requieren hospedadores apropiados. El aislamiento viral consiste en evidenciar la presencia o ausencia de un virus en una muestra sospechosa, mediante la inoculación de ésta en un sistema huésped. Muchos virus que infectan animales pueden ser cultivados en animales, tejidos o cultivos celulares (5,13 y 16).

Las enfermedades virales son una causa importante de pérdidas económicas en granjas debido a los costos médicos que incluyen muertes, diagnóstico y tratamiento, los costos de limpieza y desinfección, los costos de control y prevención. Además las pérdidas sufridas incluyen la reducción de la productividad de las aves domésticas causadas por las distintas enfermedades virales.

El procesamiento de las muestras requeridas para el aislamiento viral depende de la naturaleza de las mismas. Los tejidos se trituran con un abrasivo como polvo de vidrio o arena, en un mortero. Se suspenden en un diluyente adecuado, éste puede ser caldo triptosa fosfatado, SAF y SSF (5).

A continuación es descrito el procesamiento de las muestras y la preparación del sistema huésped para realizar el aislamiento viral.

Se realiza la destrucción tisular, macerando los órganos; para facilitararlo se recomienda usar el mortero congelado (Figura 16) y cortar los órganos en pequeños trozos con tijeras. Posteriormente se suspende el macerado en SAF (Figura 17) y se deposita en un tubo de centrifuga (Figura 18) y se procede a centrifugar de 25 a 30 mililitros (ml) del sobrenadante a 2500 gravedades durante 10 a 15 minutos, con la finalidad de obtener el sobrenadante libre de estructuras celulares y bacterias. Después de la centrifugación y en condiciones asépticas, se filtran de 7 a 8 ml de sobrenadante utilizando un filtro de hemicelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (10, 11). En este laboratorio además al inculo obtenido se le agrega antibiótico y se deja actuar 30 minutos.

Posteriormente se realiza la preparación del sistema huésped y de igual manera se realiza el proceso en condiciones asépticas. Se desinfecta la superficie del huevo embrionado de pollo con alcohol al 70 %, posteriormente con yodo al 4 % (Figura 19) y se perfora el cascarón (Figura 20) dependiendo de la vía de inoculación empleada. Posteriormente se inocula el huevo embrionado de pollo (Figura 21), introduciendo la cantidad indicada del inculo, por último se sella el cascarón con pegamento blanco. Los huevos embrionados de pollo inoculados se incuban a 37° C. El tiempo de incubación depende del virus que se interesa aislar. Diariamente se revisan con el ovoscopio, si durante este periodo algún embrión ha muerto se debe obtener el líquido alantoideo y realizar pruebas complementarias para la identificación del agente aislado (10 y 11).

Ovoscopiado de huevos embrionados de pollo. Se realiza para verificar la viabilidad del huevo con ayuda de un ovoscopio, este proceso se lleva a cabo en un cuarto oscuro. Es importante recordar que desde el momento de la fecundación inicia la multiplicación y diferenciación celular, lo que provoca que el huevo fértil al ser puesto, aloje en su interior un embrión frágil y muy susceptible al medio ambiente externo (17). El revisar los huevos embrionados con el ovoscopio nos permite certificar la edad y la viabilidad del embrión; esta información es importante al momento de elegir los huevos que serán utilizados como sistema huésped en el aislamiento viral. Las características de un huevo embrionado viable son: irrigación, movilidad del embrión de pollo, temperatura, coloración e integridad del cascarón.

<b>Cuadro 9. Vías de inoculación en el huevo embrionado de pollo (5)</b>			
<b>VIAS DE INOCULACIÓN</b>	<b>EDAD DEL EMBRIÓN (días)</b>	<b>CANTIDAD DE INOCULO (ml)</b>	<b>EJEMPLOS</b>
Cavidad alantoidea (CAL)	9-12	0.1-0.2	ENC, BI, IBF, Influenza
Membrana corioalantoidea (MCA)	10-12	0.1-0.5	LTA, VA, IBF
Cavidad amniotica	7-15	0.1-0.2	Influenza
Saco vitelino	5-8	0.2-1.0	BI, Reovirus, Encefalitis aviar, Anemia infecciosa
Intravenosa	10-15	0.02-0.05	Utilizadas en experimentación
Intracerebral	8-14	0.01-0.02	

## PRUEBAS COMPLEMENTARIAS PARA IA Y ENC

### Hemoaglutinación viral

La HA se observa a simple vista ya que los eritrocitos se conglomeran (5), esta prueba se realiza sobre una placa de plástico. Se agregan 100  $\mu$ l de líquido alantoideo, cosechado de los huevos embrionados inoculados con una muestra sospechosa, y la misma cantidad de glóbulos rojos al 2 %. El fenómeno de HA se presenta porque los glóbulos rojos se unen con partículas virales hemoaglutinantes (5).

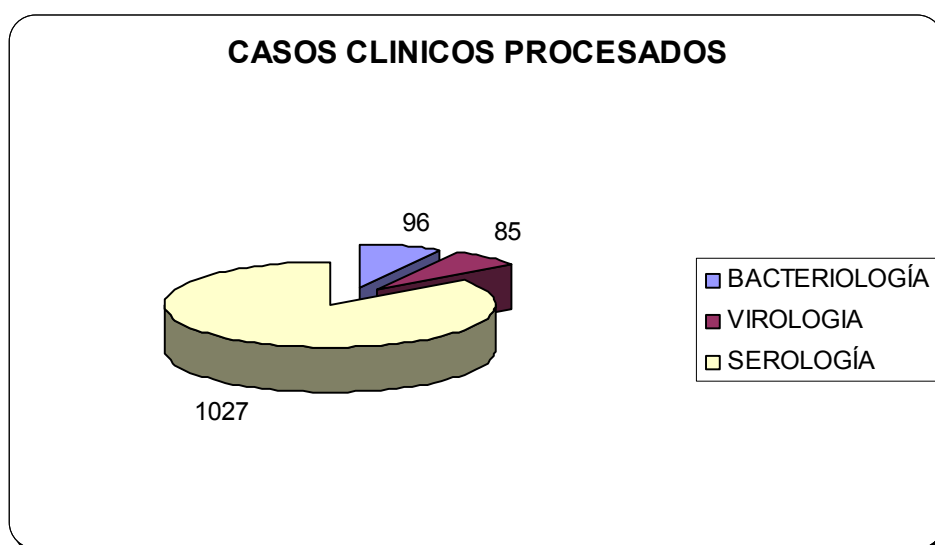
### Inhibición de la Hemoaglutinación viral

La prueba de la inhibición de la hemoaglutinación (IHA) viral se basa en la unión de anticuerpos a la hemoaglutinina del virus, resultando en inhibición de la hemoaglutinación (5). Esta prueba se realiza, por IHA método alfa en microplacas de fondo en "V", en dilución doble seriada iniciando 1:2. Esta prueba es cualitativa porque únicamente se buscan las muestras de líquido alantoideo negativas o positivas a la presencia de anticuerpos contra IA o ENC. Cada pozo de la fila 1 es el control de la muestra. Se agregan 50  $\mu$ l de SAF y únicamente se agrega la muestra problema al pozo A1, la cual será diluida y al finalizar se desecharán 50  $\mu$ l, después a los pozos de la fila 2 se le agrega el antisuero de ENC, posteriormente en el pozo A2 se agregan 50  $\mu$ l de la muestra problema la cual será diluida y se desechan 50  $\mu$ l. Se realiza el mismo procedimiento en la siguiente fila utilizando el antisuero de IA y se deja incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de la reacción se agregan 50  $\mu$ l de una suspensión de glóbulos rojos al 0.5 % y se deja incubando a temperatura ambiente por 30 minutos.

Al realizar la lectura de esta prueba se observaran las muestras positivas con la formación de un botón de glóbulos rojos de forma circular con bordes definidos que se deslizan tomando la forma de una gota en el fondo del pozo, al inclinar la microplaca en un ángulo de 45°.

Cuadro 10. Casos clínicos procesados durante una semana		
BACTERIOLOGIA	VIROLOGIA	SEROLOGIA
96 *	85 *	1027 *

\* Las cantidades son aproximadas



## CASO CLINICO

Para complementar el informe de trabajo profesional se realizará la descripción de un caso clínico de interés. El día nueve de febrero se recibieron en el laboratorio 6 tubos que contenían medio bacteriológico Frey líquido. Cabe mencionar que las muestras fueron remitidas al laboratorio en condiciones de refrigeración, utilizando geles refrigerantes y transportados en una caja térmica.

La historia clínica adjunta únicamente mencionaba que las muestras correspondían a hisopos traqueales de aves, provenientes del estado de Querétaro y los usuarios solicitaban el aislamiento bacteriológico de *Mycoplasma* spp.



## Aislamiento de *Mycoplasma* spp

Esta es la prueba más utilizada para el diagnóstico de *Mycoplasma* spp y se realizó en el área de bacteriología. El aislamiento se realiza a partir de tráquea, sacos aéreos, pulmones o fluidos de senos infraorbitarios y en ocasiones se encuentra en oviducto, semen y cloaca (18).

Los micoplasmas no tienen pared celular, por esta razón los medios de cultivo contienen niveles óptimos de proteína, para suplir la necesidad de osmolaridad, pH de 7.8, suero de origen porcino o equino, utilizado como fuente de esteroides y ácidos grasos, rojo de fenol, empleado como indicador de pH, talio y antibióticos  $\beta$ -lactámicos a los cuales son resistentes los micoplasmas por esta razón son empleados para controlar el crecimiento de otras bacterias y hongos (18).

Una vez recibidas las muestras en el área de bacteriología, éstas fueron procesadas en condiciones asépticas. A partir de los medios líquidos se realiza una primera siembra, con un asa bacteriológica se siembra en medio Frey sólido en estría continua. La segunda siembra se realiza a los 5 días de incubación, la tercera siembra se realiza a los 10 días de incubación y la cuarta siembra se realiza a los 15 días de incubación. Los caldos son examinados diariamente para observar los posibles cambios de acidez de rojo a naranja y cuando los cambios son evidentes se realiza la siembra en medios sólidos (18).

Los medios Frey sólidos sembrados se incuban dentro de una jarra GasPack System, esto debido a la necesidad de los micoplasmas por un ambiente microaerofílico y con requerimientos de CO<sub>2</sub>. A 37° C durante 21 días.

Los medios sólidos son observados con un microscopio estereoscópico (Figura 22) durante los 21 días de incubación y se determinó el crecimiento de *Mycoplasma* spp, ya que se observó el crecimiento de colonias muy pequeñas de 1 mm de diámetro, redondas, con bordes regulares y una zona circular densa localizada en el centro de la colonia; tiene la apariencia de “huevo estrellado” (Figura 23). La morfología de colonias anteriormente descrita es la típica de *Mycoplasma* spp (18).

La identificación de especies se realiza mediante Inmunofluorescencia, Inmunoperoxidasa y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La infección por micoplasmas aviares no tiene importancia en la salud pública sin embargo las pérdidas económicas por decomisos de canales, la reducción en la eficiencia alimenticia y producción de huevo, y el incremento en los costos de prevención y control son factores que incrementan los costos en la producción avícola, haciendo de esta enfermedad una de las más costosas a nivel mundial.

Así pues se recomienda el diagnóstico de *Mycoplasma* spp por medio del aislamiento porque permite un mejor control de la enfermedad, ya que a partir de éste se puede realizar pruebas de sensibilidad a antimicrobianos y obtener cepas para elaborar autovacunas endémicas de la región o de la granja (18).

## **CONCLUSIONES**

En el laboratorio el personal es prudente en sus áreas de trabajo y está consiente de la responsabilidad que tiene al laborar en un laboratorio clínico, sin embargo se necesita mayor capacitación para reforzar los conocimientos acerca de su propia seguridad y la de sus compañeros. Uno de los objetivos inmediatos del laboratorio y sobre el cual ya están trabajando, es la implementación de un programa de bioseguridad gestionado por profesionales bien entrenados, con el cual se busca un alto grado de participación por cada uno de los integrantes del laboratorio.

La estancia en las distintas áreas del laboratorio fue una excelente oportunidad de aprendizaje práctico así como teórico, donde se emplearon las técnicas más adecuadas para obtener un resultado clínico confiable. Los objetivos alcanzados principalmente fueron: la familiarización con el trabajo realizado en un laboratorio clínico privado, así como su procesamiento hasta obtener el resultado de los casos clínicos, los cuales sabemos tiene gran importancia ya que una repercuten directamente en muchas personas, que están involucradas en el ámbito avícola.

## LITERATURA CITADA

1. Departamento de Microbiología e Inmunología. Manual de prácticas de laboratorio de inmunología. F.M.V.Z. UNAM, 1999
2. Lazo García E. Manual de Seguridad en Laboratorios de Microbiología Molecular. F.M.V.Z. UNAM, 2004
3. Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipos de laboratorio de pruebas y/o análisis en materia zoonosológica
4. Departamento de Microbiología e Inmunología. Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología veterinarias. F.M.V.Z. UNAM, 1999
5. Departamento de Microbiología e Inmunología. Manual de prácticas de laboratorio de virología. F.M.V.Z. UNAM, 1999
6. Organización Panamericana de la Salud. Manual de técnicas Básicas para un laboratorio de Salud Número 2. No. 439. Washington, 1983
7. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos Biológico-Infeciosos. Clasificación y especificaciones de manejo
8. Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosológica
9. Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1995, Campaña nacional contra la Salmonelosis aviar
10. Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle presentación velogénica
11. Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña nacional contra la Influenza Aviar
12. Ortega L. et al. Manual de Prácticas de Microbiología Veterinaria. Sección de ciencias de la salud. UNAM-FES Cuautitlan. 1997

13. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. Biología de los microorganismos 10ª edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid, España 2004
14. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adalberg. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. 2005
15. Pérez M. et al. Procedimientos de laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinarias. Departamento de Bacteriología y Micología. UNAM-FMVZ. 1987
16. Cunningham CH. Virología practica. Editorial Acribia. Zaragoza, España 1971
17. Quintana JA. Avitecna 3ª edición. Editorial Trillas. México 1999
18. Tapia LEE. Aislamiento de *Mycoplasma* spp a diferentes tiempos de incubación de cultivo de gallinas comerciales (Tesis de licenciatura). Cuautitlan Izcalli, Estado de México: FES Cuautitlan 2006.