

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE TRABAJO PROFESIONAL EN LA MODALIDAD DE:
AVES, LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

SANTIAGO CRUZ NORMA FABIOLA
NÚMERO DE CUENTA 981946-69

ASESOR
Dra. Odette Urquiza Bravo



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.

A mis padres Eduardo Santiago Pérez y Sofía Cruz Cruz por su amor y su gran esfuerzo, muchas gracias.

A mis hermanos Carlos y Trinidad, a quienes les agradezco todo su tiempo, apoyo y comprensión.

A mis amigas y amigos.

A mis profesores, en especial a la Dra. Odette Urquiza Bravo por su paciencia y enseñanzas, a la Dra. Magdalena Escorcía por su motivación hacia a la excelencia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO GENERAL	6
ESTANCIA REALIZADA EN EL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL AVES.	6
1. Área de preparación de material.	6
1.1 Recepción y clasificación de material.	7
1.2 Inactivación.	7
1.3 Lavado del material.	8
1.4 Preparación del material.	9
1.5 Esterilización del material.	9
1.5.1 Calor seco	9
1.5.2 Calor húmedo	10
1.6 Verificación de esterilización.	10
2. Hematología.	11
2.1 Medición de hematocrito.	12
2.2 Determinación de la concentración de proteínas plasmáticas.	12
2.3 Determinación de la concentración de hemoglobina.	13
2.4 Extendido sanguíneo.	13
2.4.1 Tinción de Wright.	13
3. Histopatología.	14
3.1 Recepción de muestras del área de necropsias.	14
3.2 Selección e identificación de la muestra.	15
3.3 Procesamiento de órganos: deshidratación, aclaración e infiltración.	16
3.4 Inclusión en parafina.	17
3.5 Corte del bloque.	17
3.6 Adhesión de la muestra a un portaobjetos.	17
3.7 Realización de la tinción hematoxilina y eosina (HE).	18
3.8 Montaje.	19
4. Bacteriología.	19
4.1 Preparación de medios de cultivo.	20
4.2 Realización de frotis y tinción de Gram.	22
4.3 Técnica de Gentry.	23
4.3.1 Muestreo de la superficie del cascarón de huevo (muestreo externo).	24
4.3.2 Muestreo de la yema de huevo (muestreo interno).	25
4.4 Toma de muestra de agua para análisis bacteriológico.	26
4.5 Análisis bacteriológico de agua.	26
4.5.1 Recuento de coliformes por litro de muestra.	28
4.5.1.1 Prueba presuntiva.	28
4.5.1.2 Prueba confirmativa.	29
4.5.2 Cuenta viable en placa.	30
4.5.3 Licuefacción de la gelatina.	30
4.6 Análisis cuantitativo e identificación de bacterias a partir de 4 hisopos de arrastre de jaulas.	32
4.6.1 Resultados del análisis cuantitativo.	32

4.6.2	Realización de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias.	33
4.6.3	Bacterias identificadas.	34
	ESTANCIA REALIZADA EN UNA EMPRESA DEDICADA A LA PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS PARA AVES EN EL ÁREA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD.	35
1.	Preparación de medios de cultivo.	35
1.1	Prueba de esterilidad de medios de cultivo.	36
2.	Toma de muestras de sangre para la preparación de eritrocitos al 2%.	36
3.	Pruebas de esterilidad.	37
3.1	Prueba de esterilidad para suero de caballo, suero de pollo, diluentes y vacunas emulsionadas.	37
3.1.2	Método.	38
3.2	Prueba de esterilidad para líquido alantoideo cosechado de embriones infectados con el virus de Influenza Aviar, Enfermedad de Newcastle y Bronquitis Infecciosa.	39
3.2.1	Toma de muestra de la cosecha.	39
3.2.2	Aceptación y rechazo de cosechas.	40
4.	Prueba de estabilidad de la emulsión de vacunas.	40
5.	Prueba de calidad de la emulsión de vacunas.	40
6.	Titulación de virus: Enfermedad de Newcastle, Influenza Aviar y Bronquitis Infecciosa.	40
6.1	Determinación del título del virus de la Enfermedad de Newcastle, Influenza Aviar.	40
6.1.1	Procedimiento.	41
6.1.2	Prueba de hemoaglutinación rápida en placa.	42
6.2	Determinación del título del virus de Bronquitis infecciosa.	43
6.2.1	Interpretación de resultados.	44
1.	Material.	45
2.	Desinfección de las chapas de las puertas.	45
3.	Toma de muestra.	45
4.	Procesamiento de la muestra.	45
5.	Resultados.	46
	BIBLIOGRAFÍA	47

INTRODUCCIÓN

El sector avícola mexicano participa con el 63.3% de la producción pecuaria; 33% aporta la producción de pollo, 30.1% la producción de huevo y 0.20% la producción de pavo.¹

De 1994 a 2005 se observó que el consumo de insumos agrícolas aumentó el 3.9% anual siendo la avicultura la principal industria transformadora de proteína vegetal en proteína animal y México cuenta con una parvada de más de 130 millones de gallinas ponedoras, 243 millones de pollos al ciclo y 865 mil pavos por ciclo.¹

Es aquí donde radica la importancia de la participación en este sector, los niveles de crecimiento aumentan haciendo imprescindible realizar seguimientos de las parvadas para mejorar aun más la producción así como para obtener productos de calidad. Para ello es necesaria la ayuda de los laboratorios de diagnóstico para evaluar en forma regular el estado de salud de las aves.

El laboratorio de diagnóstico es un recurso muy importante para el manejo adecuado de una empresa avícola, permite evaluar de manera oportuna las medidas de bioseguridad, manejo, nutrición, sanidad empleadas.

Por medio del laboratorio se pueden determinar el estado de salud de una parvada, detectar problemas sanitarios subclínicos, evaluar la eficacia de los programas de inmunización, cuantificar el grado de microbismo ambiental y evaluar la calidad de los insumos y de los productos obtenidos y con los datos proporcionados plantear posibles soluciones con las que a su vez se puede incrementar de una manera significativa la eficiencia productiva de una empresa.²

OBJETIVO GENERAL

Al término del trabajo profesional supervisado, el alumno tiene la experiencia de haberse incorporado a la vida profesional, conociendo y aplicando la metodología para obtener, preservar, manejar y enviar muestras al laboratorio, integrando los conocimientos y habilidades adquiridas para obtener un diagnóstico, llegar al tratamiento y a la forma de prevenirlo.

Para cumplir con el objetivo anterior, se realizó una estancia en el Departamento de Producción Animal Aves (DPAA)* de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México y en un laboratorio privado de producción de biológicos ubicado en la ciudad de México.

* Departamento de Producción Animal Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, México, D.F. CP 04510, Apartado postal 70-483 y 70-486

ESTANCIA REALIZADA EN EL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL AVES.

Las actividades llevadas a cabo se realizaron en las siguientes secciones del DPAA:

- 1. Área de preparación de material**
- 2. Hematología**
- 3. Histopatología**
- 4. Bacteriología**

1. Área de preparación de material.

La estancia realizada en el área de preparación de material comprendió del día 25 de septiembre al 27 de octubre de 2006.

Objetivo: Procesar material sucio y contaminado de los laboratorios del DPAA; lavado, preparación y esterilización para su posterior empleo en los diferentes laboratorios de diagnóstico del DPAA (Figura 1).



Figura 1. Recepción de material a procesar

Las actividades realizadas fueron las siguientes:

1.1 Recepción y clasificación de material.

En los laboratorios del DPAA, el material se clasifica en:

* Material contaminado reutilizable. Es el material que estuvo en contacto con microorganismos potencialmente patógenos y para ser utilizado nuevamente se inactiva en autoclave antes de su lavado y esterilización.

* Material contaminado desechable. Es el material que estuvo en contacto con microorganismos potencialmente patógenos y debe ser inactivado antes de ser desechado a la basura municipal según la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

* Material sucio. Es el material que no estuvo en contacto con microorganismos potencialmente patógenos y por lo tanto el proceso de lavado y esterilización es suficiente para volver a utilizarlo.

1.2 Inactivación.

La inactivación se realiza mediante la utilización de la autoclave a una temperatura de 121° C, a una presión de vapor de 15 lbs durante 20 min, Cork y Susan 2002 mencionan que al mantener estas constantes todos los microorganismos son eliminados.³

1.3 Lavado del material.

Posterior a la inactivación, el lavado inicia con un prelavado y cepillado con detergente comercial, se deja remojar por 24 h, se enjuaga con agua corriente y se sumerge en agua con cloro al 13% durante 24 h (Figura 2). Se recomienda que antes de introducir el material al cloro éste debe estar libre de detritos orgánicos debido a que estos provocan su inactivación.⁴



Figura 2. Material en agua con cloro

Transcurrido este tiempo el material es cepillado y enjuagado con agua corriente, enseguida el material se sumerge en una mezcla de agua con un detergente alcalino durante 24 h (Hyclin, 20 g/L de agua). Si el material se clasifica como sucio, se sumerge directamente en el detergente alcalino y posteriormente se vuelve a cepillar y enjuagar con agua corriente. Por último el material es enjuagado con agua bidestilada varias veces, se deja escurrir y secar a temperatura ambiente (Figura 3).



Figura 3. Secado de material

1.4 Preparación del material.

Una vez que el material está limpio y seco se prepara para su posterior esterilización, para ello previamente a los matraces, probetas y vasos de precipitado se les coloca un tapón con papel aluminio, a las pipetas volumétricas y Pasteur se les coloca un trozo de algodón en el extremo

proximal y se flamea para retirar las fibras de algodón que sobresalen, enseguida se introducen en estuches de acero inoxidable (Figura 4 y 5).



Figura 4. Preparación de pipetas para ser esterilizadas.



Figura 5. Material preparado para esterilizar.

1.5 Esterilización del material.

El objetivo de la esterilización es la eliminación de microorganismos en el material de laboratorio, quirúrgico y diferentes sustancias.⁵

La esterilización puede ser llevada a cabo mediante:

1.5.1 Calor seco

Se emplea para material de cristalería, el cual se coloca dentro del horno Pasteur a $190^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ durante 2 h (Figura 6). Los mecanismos de acción son:

- a) Desnaturalización y coagulación de proteínas.
- b) Oxidación de componentes vitales de la célula.
- c) Efecto tóxico por la alta concentración de electrolitos, consecuencia de la deshidratación celular.⁵

1.5.2 Calor húmedo

Se emplea para esterilizar plástico, vidrio, o medios de cultivo, para ello se utiliza el autoclave durante 15 min a 121°C y 21 lbs de presión (Figura 7). Los mecanismos de acción son:

- a) Desnaturalización y coagulación de proteínas.
- b) Daño en la membrana celular, afectando el paso de solutos al interior y la salida de éstos, principalmente ácidos y iones K +.
- c) Daño en la respiración celular cuyo mecanismo reside en la membrana.
- d) Daño en el inicio de la síntesis de proteínas.
- e) Autodegradación de ácidos nucleicos.⁵



Figura 6. Esterilización en horno Pasteur. Figura 7. Esterilización en autoclave

Se ha observado que la esterilización puede fracasar si los paquetes están envueltos con un ajuste excesivo o se cargan en forma inadecuada en el autoclave, para evitarlo, entre cada paquete debe existir cierta cantidad de aire para facilitar el flujo del vapor (1-2 pulgadas entre cada paquete y paredes circundantes).⁴

1.6 Verificación de esterilización.

En esta área es muy importante la verificación de la esterilidad ya que algún error en ésta puede alterar los procedimientos que se realizan en las demás secciones del laboratorio. Para verificar que el autoclave funcione de manera adecuada se coloca una ampolleta de bioindicador,^a son viales que contiene esporas de *Bacillus stearothermophilus* (Figura 8).

^a Merk. Alemania. 7953

El bioindicador se coloca junto al material que se va a esterilizar. Una vez terminado el ciclo la ampolleta se incuba a 60° C durante 48 h junto con otra ampolleta que no hubiera sido sometida al proceso de esterilización para utilizarla como control.

Posterior a las 48 h las ampolletas se revisan y se registran los resultados en las bitácoras correspondientes.



Figura 8. Ampolleta bioindicadora

Interpretación de resultados: un cambio de coloración de violeta a amarillo y turbidez en el medio indican un ciclo de esterilización incorrecta. Ampolleta sin cambio de coloración indica esterilización correcta.

Esto se realizar una vez por mes.

Todas las actividades realizadas en el área de preparación de material se registran en las bitácoras respectivas.

2. Hematología.

La estancia comprendió del día 16 al 20 de octubre del 2006. La aplicación más común de la hematología es hacer una revisión de la salud general de un animal y evaluar su capacidad general para transportar oxígeno y defenderse contra agentes infecciosos.

Las actividades realizadas fueron las siguientes:

- Medición de hematocrito.
- Determinación de la concentración de proteínas plasmáticas.

- Determinación de la concentración de hemoglobina.
- Extendido sanguíneo.

2.1 Medición de hematocrito.

Para esto se utiliza una muestra de sangre con heparina 0.1ml/ ml de sangre contenida en un vial, se homogeniza gentilmente, posteriormente se colecta la sangre en un tubo capilar heparinizado y se sella uno de los extremos con calor (mechero). El tubo se centrifuga^b a 3,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min, transcurrido el tiempo el tubo capilar se retira de la centrifuga y se observa que la sangre se divide en 3 fracciones: plasma, capa de leucocitos y glóbulos rojos.

Posteriormente el tubo capilar se coloca en el lector para hematocrito de Wintrobe.^c

El resultado obtenido de la muestra fue de 50% la cual se encuentra dentro del rango de referencia (35-55%).⁶

2.2 Determinación de la concentración de proteínas plasmáticas.

Las proteínas plasmáticas se miden en el refractómetro de Goldber.^d

Se basa en el principio de que al atravesar un líquido, las ondas de luz se desvían de su dirección original (refracción), debido a las partículas sólidas presentes en la solución.

El grado de refracción está en función a cantidad y el tipo de partículas sólidas presentes.⁷ Para realizar esta prueba se coloca una gota de plasma sobre la cara del prisma del refractómetro, esta gota se obtiene rompiendo el tubo capilar a la altura de la capa de leucocitos, se cierra la cubierta del refractómetro, se orienta hacia una fuente de luz y se observa una línea horizontal que cruza una escala que indica la concentración de proteínas plasmáticas en g/dl.

^b Clay Adams. New York, USA. 07054.

^c Sol- BaT. México.

^d Schuco. USA.5711

El resultado obtenido fue de 4 g/dl. Los valores se encuentran dentro del rango de referencia (3-6 g/dl)⁶

2.3 Determinación de la concentración de hemoglobina.

La concentración de hemoglobina se determina a través del hemoglobinómetro^e (Figura 9), que consiste en hemolizar una pequeña muestra de sangre con bastoncitos aplicadores que contienen oxalato de sodio.

La muestra se coloca en una placa de cristal transparente y se pone la cubierta evitando la formación de burbujas y espacio entre las placas. Posteriormente se realiza la lectura igualando tonos verdes a través de perillas.

El resultado fue de 8.2 g/dl, el cual se encuentra dentro del rango (7.4-13.1g/dl).⁵

2.4 Extendido sanguíneo.

Para el extendido sanguíneo (frotis), se deposita una gota de sangre en uno de los extremos de un portaobjetos. La gota de sangre se extiende sobre este portaobjetos mediante el deslizamiento uniforme en forma angular (Figura 10). El frotis se deja secar a temperatura ambiente 5 min y se tiñe con Wright.

2.4.1 Tinción de Wright.

El método consiste en cubrir la extensión sanguínea con tinción de Wright (solución de eosina-azul de metileno) por 3 min, se enjuaga la laminilla a chorro de agua. En seguida se cubre con solución amortiguadora (solución de fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico) durante 10 min, se vuelve a enjuagar con agua corriente y se deja secar al aire. Posteriormente se observa al microscopio las células sanguíneas contando cada célula de cada tipo. Los resultados obtenidos fueron: linfocitos 40%, monocitos 2%, trombocitos $21 \times 10^3/\mu\text{l}$, eosinófilos 1%, basófilos 3%, los cuales se encuentran dentro del rango de referencia.

^e LEICA.Hb. Inc. USA.

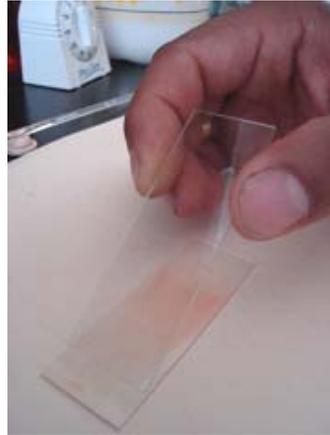


Figura 9. Hemoglobinómetro. Figura 10. Extendido sanguíneo.

Los valores normales son: linfocitos 38-78%, monocitos 2-10%, trombocitos $20-30 \times 10^3/\mu l$, eosinófilos 0-2%, basófilos 2-10%.⁵

3. Histopatología.

La estancia realizada en esta sección fue del día 9 al 13 de octubre del 2006. Las actividades fueron las siguientes:

- Recepción de muestras del área de necropsias.
- Selección e identificación de la muestra.
- Procesamiento de órganos: deshidratación, aclaración, infiltración.
- Inclusión en parafina.
- Corte del bloque.
- Adhesión de la muestra a un portaobjetos.
- Realización de la tinción hematoxilina-eosina (HE).
- Montaje.

3.1 Recepción de muestras del área de necropsias.

Las muestras llegan en frascos de vidrio conteniendo formalina al 10%. El objetivo de fijar las muestras para histopatología es: 1) prevenir la autólisis *postmortem* por inactivación de enzimas hidrolíticas; 2) facilitar la obtención de cortes mediante endurecimiento de los tejidos; 3) intensificar la tinción al actuar

como mordentes; 4) reducir el arrastre de agua de muchos de los componentes durante el proceso ulterior; 5) estabilizar los componentes para que se acerquen a su condición *in vivo* y; 6) proteger al histólogo mediante sus propiedades antisépticas.⁸

Una vez que se reciben y revisan las muestras se registran en la bitácora de recepción de muestras. Los casos en los que se tuvo la oportunidad de trabajar fueron: 06-692 (4 pulmones), 06-694 (2 proventrículos, 4 tonsilas cecales, 3 encéfalos, 1 duodeno), 06-703 (2 tráqueas, 2 pulmones, 2 laringes, 1 proventrículo).

El grosor de la muestra depende del tejido, pero como regla general no debe ser mayor de 0.5 cm² y debe ser colocado en un frasco que contenga por lo menos diez veces su volumen de fijador.⁹

3.2 Selección e identificación de la muestra.

Este proceso se realiza dentro de una campana de extracción de gases* (Figura 11 y 12).



Figura 11. Campana de extracción de gases.



Figura 12. Muestras para procesar dentro de la campana de extracción de gases.

Para poder seleccionar y precortar las muestras, éstas se extraen del fijador y se colocan en un cedazo para escurrir el fijador en un contenedor de plástico,

* BG. México.1780.

posteriormente las muestras se colocan en una tabla de parafina para su corte y posteriormente se encapsulan en contenedores de plástico o acero inoxidable y se identifican con el número de caso (Figura 13 y 14).



Figura 13. Corte de tejidos.



Figura 14. Encapsulamiento.

3.3 Procesamiento de órganos: deshidratación, aclaración e infiltración.

Son pasos secuenciales designados para remover toda el agua que se pueda extraer de los tejidos y reemplazarla con un medio que solidifique para así permitir el corte de estos tejidos, para ello las cápsulas se colocan en un procesador “histokinette”^b en donde se sumergen automáticamente en alcohol a concentraciones crecientes para deshidratar al órgano, posteriormente para aclarar a los órganos se tratan con xilol (Figura 15).



Figura 15. Procesamiento de órganos en el histokinette.

Esquema para procesamiento de órganos.

1. Alcohol al 80 % /1 h.

^b Junj. Histokinette. Alemania. 2000.

2. Alcohol al 95 % /1 h.
3. Alcohol absoluto, 3 cambios/ 1 h cada uno.
4. Xileno, 3 cambios/1 h cada uno.¹⁰

3.4 Inclusión en parafina.

Los órganos se colocan en un molde de metal con parafina fundida hasta que se infiltre por completo, posteriormente se refrigera para que se enfríe y solidifique (Figura 16).



Figura 16. Obtención de bloques posterior a la refrigeración.

3.5 Corte del bloque.

Una vez que la parafina solidifica y endurece, se retira del molde y se monta en el microtomo^c, que es un aparato equipado con una navaja. Se hacen cortes muy finos de aproximadamente $5 \mu\text{m}$ de espesor (Figura 17 y 18).

3.6 Adhesión de la muestra a un portaobjetos.

Después de obtener el corte adecuado, se sumerge en un baño de flotación con gelatina bacteriológica (1g/500 ml de agua) a una temperatura de 35°C para que se pueda estirar la muestra y de esta manera manipularla sin dañar el corte, después se introduce un portaobjetos y se toma la muestra (Figura 19). El portaobjetos con la muestra se coloca en una estufa por 15 minutos a 60°C para retirar el exceso de parafina.

^c Spencer. México.820



Figura 17. Montaje de la muestra en el microtomo.



Figura 18. Corte de la muestra en el microtomo.



Figura 19. Toma de la muestra del baño de flotación.

3.7 Realización de la tinción hematoxilina y eosina (HE).

Una vez desparafinada la muestra, esta se tiñe con HE, que consiste en sumergir el portaobjetos con la muestra en xilol 1 por 5 min; xilol 2 por 5 min; alcohol al 100% por 30 seg; alcohol al 96% por 30 seg; alcohol al 96% por 30 seg; agua por 30 seg; hematoxilina por 5 min, luego se enjuagan con agua por 30 seg; enseguida se sumerge en alcohol ácido y se extrae rápidamente, agua por 30 seg; hidróxido de amonio por 30 seg; agua por 30 seg, alcohol al 96% por 30 seg, eosina por 5 min. alcohol al 96% por 30 segundos; alcohol al 96% por 30 segundos; alcohol al 100% por 30 segundos; alcohol al 100% por 30 segundos; xilol por 5 min; y por último xilol por 5min.

La hematoxilina es una base que tiñe de manera preferencial los componentes ácidos de la célula de color azul. Puesto que casi todos los componentes ácidos son DNA y RNA, el núcleo y las regiones del citoplasma ricas en

ribosomas se tiñen de color azul oscuro. La eosina es un ácido que tiñe los componentes básicos de la célula de color rosa, debido a que muchos de los constituyentes del citoplasma tienen un pH básico, las regiones del citoplasma se tiñen de color rosa.¹¹

3.8 Montaje.

Una vez teñida la muestra, se coloca sobre el portaobjetos una gota de resina y un cubreobjetos, se rotula la laminilla con un lápiz de punta de diamante con el número de caso. Posteriormente las laminillas obtenidas se envían al patólogo responsable para su lectura, interpretación y posible diagnóstico (Figura 20).



Figura 20. Laminillas para ser interpretadas

4. Bacteriología.

La estancia realizada en esta sección comprendió del día 30 de octubre al 1 de diciembre del 2006. Las actividades realizadas fueron las siguientes:

- Preparación de medios de cultivo.
- Realización de frotis y tinción de Gram.
- Técnica de Gentry.
- Toma de muestra de agua para análisis bacteriológico.
- Análisis bacteriológico de agua.
- Análisis cuantitativo e identificación de bacterias a partir de 4 hisopos de arrastre de jaulas.

4.1 Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas permiten el desarrollo de microorganismos.¹²

Los medios de cultivo se clasifican de acuerdo a sus características físicas (Cuadro 1).

La presentación comercial de los medios de cultivo es en polvo y su preparación se realiza de acuerdo al instructivo, el medio se pesa en una balanza, posteriormente el polvo se deposita en un matr az y se hidrata con agua bidestilada (se siguen instrucciones en etiqueta).

Cuadro1. Clasificación de medios de cultivo de acuerdo a sus características f�sicas¹¹.	
Medios líquidos	No contienen agar y se siembran por agitación del asa.
Medios semisólidos	Contienen 0.5-0.75% de agar, se siembra con asa recta por picadura.
Medios sólidos	Contienen 1.5% de agar y se siembra por estría continua.
Medios duros	Contiene 3-7 % de agar, se siembra por estría continua o picadura.

Una vez hidratado el medio se esteriliza en autoclave a 121  C, 15 lbs de presión por 15 min (según instructivo). Se permite su enfriamiento a 55  C y se vierten en cajas de Petri (ocupando la mitad de su capacidad).

Los medios también se clasifican por su contenido para promover o inhibir el desarrollo de ciertos organismos.¹² Estos pueden ser:

- Medios generales: promueven el desarrollo de bacterias y hongos poco exigentes ya que contienen los mínimos requerimientos nutricionales. Son utilizados para análisis cuantitativos, conservación de cepas y muestreo del medio ambiente o superficie. Ejemplos: agar nutritivo, agar tripticasa soya (TSA), caldo nutritivo y agar Sabouraud dextrosa (SDA).¹²

- Medios enriquecidos: son medios que se suplementan con factores de crecimiento para el desarrollo de bacterias y hongos de requerimientos nutricionales exigentes. Ejemplo: agar sangre, agar Sabouraud con ácido nicotínico, caldo infusión cerebro corazón, etc.¹²

- Medios selectivos: estos medios contienen sustancias inhibitorias para suprimir parcial o totalmente el desarrollo de microorganismos no deseados. Los medios selectivos tienen una gran utilidad para el aislamiento de gérmenes patógenos a partir de muestras clínicas que contengan microflora normal. Ejemplo: agar McConkey (McC), verde brillante (VB), agar sal manitol (MSA), etc.¹²

- Medios diferenciales: estos medios contienen indicadores como rojo de fenol, rojo neutro o fucsina básica, etc que permiten diferenciar géneros o especies de algunos microorganismos por el aspecto característico de sus colonias. La mayoría de los medios selectivos son también diferenciales. Ejemplo: McC, VB y MSA.¹²

- Medios de enriquecimiento: estos medios son líquidos y poseen efectos inhibitorios sobre ciertos géneros bacterianos favoreciendo al mismo tiempo el desarrollo de otros que se encuentran en menor proporción en la muestra. Ejemplo: caldo tetrionato y caldo selenito, utilizados para el crecimiento de *Salmonella*.¹²

- Medios de transporte: son medios utilizados para el transporte de muestras clínicas desde el lugar de su colección hasta el laboratorio. La finalidad es preservar la viabilidad del organismo cuyo aislamiento va a intentarse posteriormente. Ejemplo: Stuart, Campy-thio, etc.¹²

Estos medios son esenciales en la sección de bacteriología por los que un control en su preparación, conservación y uso asegura resultados confiables (Figura 21).



Figura 21. Preparación de medios de cultivo.

4.2 Realización de frotis y tinción de Gram.

Con un asa bacteriológica se coloca una pequeña muestra del cultivo bacteriano en un portaobjetos, posteriormente se agrega una gota de agua destilada (cuando el cultivo proviene de un medio sólido), se mezcla para formar una capa fina y se deja secar a temperatura ambiente, una vez seco el frotis, se pasa por el mechero con la capa de frotis hacia arriba para que se fije, posteriormente se tiñe con Gram.

La tinción de Gram es aplicada en forma universal como primer paso en la identificación de bacterias y levaduras. Este método divide a las bacterias en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas de acuerdo a los componentes predominantes de su pared celular y permite así mismo la observación microscópica de la morfología (cocos, bacilos), el tamaño y la agrupación (cadenas, racimos).¹²

La técnica consiste en cubrir el frotis realizado previamente con la solución de cristal violeta (colorante primario) y bicarbonato de sodio, se deja actuar por 15 seg y se lava con agua corriente, enseguida se coloca yodo durante 15 seg y se lava con agua corriente, se coloca alcohol acetona (decolorante) durante 3 seg, y se lava con agua corriente, posteriormente se coloca la fucsina básica (colorante de contraste) y se deja actuar por 15 seg, se lava con agua corriente, por último se deja secar a temperatura ambiente. Una vez seco el frotis se coloca una gota de aceite de inmersión y se observa al microscopio de luz (Figura 22 y 23).

Al colorear los microorganismos con cristal violeta y añadirles una solución de yodo, se combinan éstos con algunos componentes de la célula bacteriana y son retenidos por la pared celular. La solución de bicarbonato aplicada junto con el colorante primario actúa únicamente como catalizador de la reacción. Posteriormente, cuando se tratan con alcohol acetona, la pared de las Gram positivas sufre una deshidratación que impide la salida del colorante. En el caso de las Gram negativas, 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 es incapaz de penetrar en la pared del primer grupo, mientras que sí es incorporada en la pared del segundo grupo mencionado.¹²

Por lo tanto, los microorganismos que conservan el cristal violeta se observarán de color azul (Gram positivos) y los que no lo hacen mostrarán un color rosa que corresponde a la fucsina básica (Gram negativos).¹²

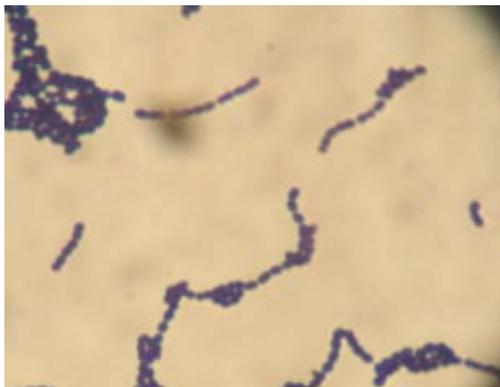


Figura 22. Observación de cocos Gram positivo.



Figura 23. Observación de bacilos Gram positivo.

4.3 Técnica de Gentry.

Esta técnica es una prueba cuantitativa para muestreo externo y cualitativa para muestreo interno, por lo que para el muestreo externo se realizan diluciones de la muestra para su posterior cuantificación de microorganismos por muestra.¹³

La técnica consiste en un lavado de cascarón con PBS (solución amortiguadora de fosfatos) para hacer diluciones décuples y sembrar en medios generales y diferenciales para detectar bacterias en la superficie del huevo (muestreo

externo) y luego determinar la existencia de bacterias en la yema (muestreo interno).

A manera de práctica, se realizó la técnica de Gentry en 3 muestras de huevo (Figura 24).

Para el procesamiento de las muestras de huevo se requiere que éstos lleguen en bolsas de plástico estériles evitando contaminación y posiblemente una alteración de los resultados al ser tomados con la mano.

4.3.1 Muestreo de la superficie del cascarón de huevo (muestreo externo).

4.3.1.1 Cada muestra se identifica con el número de caso, escrito en el exterior de la bolsa.

4.3.1.2 Se depositan 9 ml de PBS estéril en cada bolsa de cada huevo (Figura 25).



Figura 24. Muestras de huevo para analizar.



Figura 25. Colocación de PBS a la bolsa conteniendo la muestra de huevo.

4.3.1.3 Se realiza la remoción de partículas de la superficie del huevo frotando sus paredes con la bolsa y se deja reposar por 5 min, posteriormente se resuspenden las partículas homogenizándolas con una pipeta.

4.3.1.4 Por cada muestra de huevo se preparan diluciones décuples de 10^{-1} a 10^{-6} en tubos.

4.3.1.5. Con una micropipeta, se toman 20 μl de cada muestra y se siembra en 3 puntos de una división de una caja de Petri fraccionada en 3 partes. Cada cuadrante corresponde a una dilución diferente (Figura 26).

Para la siembra se emplea TSA^d, McC,^h MSA^h y SDA,^h una vez absorbida la solución en el agar, se incuban los medios a 37° C por 18 a 24 h.

4.3.1.6 Se realiza el conteo bacteriano de las muestras y se registran los resultados.



Figura 26. Siembra de la muestra.

Resultados: Para el huevo A, los resultados obtenidos en cuenta general fueron 5×10^3 UFC/g. No se observó desarrollo en los medios de McC, MSA y SDA. No se observó desarrollo en los huevos B y C en ninguno de los medios.

4.3.2 Muestreo de la yema de huevo (muestreo interno).

4.3.2.1 Cada huevo se saca de la bolsa de plástico y se desinfecta la superficie del cascarón con alcohol al 70%, posteriormente con la ayuda de unas pinzas y tijeras estériles se corta la punta aguda del cascarón para obtener más fácilmente la yema.

4.3.2.2 Se colecta 0.5 ml de yema con una jeringa estéril y se deposita en tubos de ensaye conteniendo 4.5 ml de solución de PBS estéril.

4.3.2.3 Se homogeniza la mezcla mediante el uso de un agitador (vortex)ⁱ

4.3.2.4 Se toma una azada (1 μl aproximadamente) de la muestra y se siembra por estría continua en cultivo puro en una caja de Petri conteniendo TSA, MSA, McC y SDA por separado.

^d Becton Dickinson, México.17116

ⁱ Genie.Inc. NY.17716.

4.3.2.5 Las cajas se incuban a 37° C por 18 a 24 h y se efectúa la lectura.

4.3.2.6 En el caso del medio de SDA, después de las 18 h de incubación las cajas permanecen a temperatura ambiente y humedad durante 10 días revisando diariamente el desarrollo.

4.3.2.7 Se registran los resultados del desarrollo bacteriano en los formatos de resultados de análisis bacteriológico (FAM-DPAA-MV-021 y FAM-DPAA-MV-006).

Los resultados obtenidos del muestreo interno de los 3 huevos fueron negativos al desarrollo bacteriano en todos los medios de cultivo empleados.

4.4 Toma de muestra de agua para análisis bacteriológico.

La primera muestra se colecta del grifo, para esto lo primero que se realiza es desinfectar el área del grifo con alcohol al 70%, posteriormente se flamea, se deja enfriar, enseguida se abre la llave para que fluya el agua durante algunos segundos y con un frasco estéril se colecta la muestra (Figura 27,28 y 29).

Se colectaron 2 muestras de 100 ml cada una y sólo a una se le agregó 0.1 ml de tiosulfato de sodio (Na^{*}), la tercera muestra se obtuvo del wc (100 ml).

4.5 Análisis bacteriológico de agua.

El objetivo de esta prueba es determinar la presencia de coliformes en agua según la norma NOM-113-SSA1-1994 y NOM-127-SSA1-1994. El agua potable desde el punto de vista bacteriológico es el agua que no contiene contaminación fecal, minerales y que se considera satisfactoria para el consumo doméstico.¹⁴

En el laboratorio de bacteriología del DPAA la potabilidad del agua se determina por la presencia de bacterias coliformes.

Las bacterias coliformes son bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos, que a 35° C fermentan la lactosa con la producción de gas¹³ (Figura 30).

* Technical quimical. México.1140



Figura 27. Desinfección del grifo.



Figura 28. Flameado del grifo.



Figura 29. Colección de la muestras de agua.

Para analizar la potabilidad del agua se realizan las siguientes pruebas:

- Recuento de coliformes por litro de muestra:
 - Prueba presuntiva.
 - Prueba confirmativa
- Cuanta viable en placa.
- Licuefacción de la gelatina.

Durante la estancia realizada se analizaron 6 muestras de agua para determinar su potabilidad desde el punto de vista bacteriológico.

Las muestras fueron:

- a. Control negativo (agua potable conocida).
- b. Agua de tubería.
- c. Agua de pozo.
- d. Agua de grifo con tiosulfato de Na
- e. Agua de grifo sin tiosulfato de Na.
- f. Agua de excusado.

4.5.1 Recuento de coliformes por litro de muestra.

4.5.1.1 Prueba presuntiva.

Se realiza en caldo lactosado a doble concentración utilizando 5 tubos con 10 ml del medio y un tubo de fermentación invertido (tubo de Durham) para cada muestra.



Figura 30. Bacterias fermentadoras de lactosa en el medio de McC.

El caldo lactosado es un medio general, que promueve el desarrollo y crecimiento de microorganismos nutricionalmente poco exigentes.⁵ En este caso se hace necesario elaborar el medio a doble concentración ya que al depositar el agua problema se diluyen los nutrientes. Se depositan 10 ml de cada muestra en 5 tubos, se incuban a 37° C y cada tubo se examina a las 24 h posteriores, evaluando turbidez y presencia de gas (auxiliándose del tubo de Durham).

Si no se observa gas se incuba 24 h más. La formación de gas en los tubos constituye una prueba presuntiva positiva.⁵

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 a 48 h, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.¹⁵

4.5.1.2 Prueba confirmativa.

Del tubo donde se observó mayor cantidad de gas, se toma una asada y se siembra en agar McC por estría continua para realizar la prueba confirmativa. La caja de McC se incuba durante 24 h a 37°C para obtener la lectura.

De las colonias aisladas en el agar McC, se toma una colonia y se siembra en un tubo con caldo lactosado simple con un tubo de Durham y se incuba por 24 h a 37°C .

Si el resultado obtenido posterior a esta incubación es la presencia de gas, significa que la prueba confirmativa fue positiva (Figura 31). El agua problema contiene bacterias productoras de gas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de la prueba confirmativa		
Muestra de agua	Presencia de gas	Número Más Probable
a. Control negativo	Ningún tubo con gas	< 20 coliformes/ L*
b. Agua de tubería	1 tubo con gas	20 coliformes/ L*
c. Agua de pozo	2 tubos con gas	60 coliformes/L*
d. Agua de grifo con tiosulfato de Na	Ningún tubo con gas	< 20 coliformes/ L*
e. Agua de grifo sin tiosulfato de Na	Ningún tubo con gas	< 20 coliformes/ L*
f. Agua del wc	Ningún tubo con gas	< 20 coliformes/ L*



Figura 31. Presencia de gas en el tubo de Durham.

* Pérez Martínez. ⁵

4.5.2 Cuenta viable en placa.

El procedimiento se inicia con la homogenización de la muestra y la realización de diluciones décuples (1:10) de las muestras de agua en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), desde 10^{-1} a 10^{-6} . Posteriormente se siembra 1 ml de cada dilución del agua problema en 20 ml de TSA licuado, se homogeniza la mezcla con movimientos giratorios y se permite solidificar el agar, las cajas se incuban a 37° C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación se realiza el conteo de colonias totales y se reporta en unidades formadoras de colonias (UFC).

Los resultados fueron los siguientes: Sólo en las muestras b y c se observó desarrollo de colonias (Figura 32), en las muestras a, d, e y f no hubo desarrollo de colonias.

En ésta misma fase se aprovecha para observar la existencia de colonias que produzcan pigmento y mal olor.

4.5.3 Licuefacción de la gelatina.

Se siembran 0.5 ml de la muestra de agua en 4.5 ml de gelatina nutritiva contenida en un tubo de ensayo, se incuba a 37° C durante 18 a 24 h, luego los tubos se refrigeran a 4° C durante 2 h.

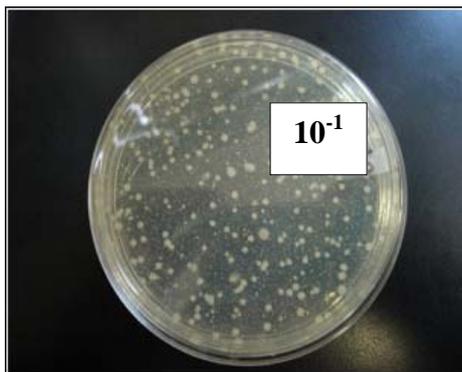


Figura 32. Desarrollo de colonias de la muestra de agua de pozo. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 6 h para observar si la gelatina permanece sólida. Los resultados fueron los siguientes:

Sólo las muestras de agua b y c licuaron la gelatina, por lo que la prueba fue positiva a gelatinasa (Cuadro 3).

Los resultados fueron los siguientes:

Cuadro 3. Resultados finales del análisis bacteriológico de agua.					
Muestra de agua	Colonias/L	Producción de gas	Producción de gelatinasa	Producción de pigmento	Producción de mal olor
a. Control negativo	-----	(-)	(-)	(-)	(-)
b. Agua de tubería	135 X 10 ⁷ UFC/L	(+)	(+)	(-)	(+)
c. Agua de pozo	147 X 10 ⁷ UFC/ ml	(+)	(+)	(-)	(+)

De acuerdo a los resultados anteriores se determinó que las muestras de agua d, e y f son potables desde el punto de vista bacteriológico.

4.6 Análisis cuantitativo e identificación de bacterias a partir de 4 hisopos de arrastre de jaulas.

Se determinaron coliformes, *Staphylococcus sp*, hongos (*Aspergillus sp* o *Penicillium sp*) y conteo total.

Para este tipo de análisis es necesario hacer diluciones décuples 10^{-1} a 10^{-6} . Se siembran 3 gotas de $20 \mu\text{l}$ de cada dilución de cada muestra en cajas conteniendo TSA, McC, MSA y SDA fraccionadas en 3, cada fracción corresponde a una dilución diferente, se incuban a 37°C por 24 h, el medio de SDA se incuba por 10 días más, debido a que el crecimiento de los hongos puede ser más lento.¹⁶

4.6.1 Resultados del análisis cuantitativo.

Para el conteo total de colonias se tomaron en cuenta solo las diluciones con mayor a 15 UFC/ $60 \mu\text{l}$ y menor a 300 UFC/ $60 \mu\text{l}$ de los 4 hisopos.

Cuadro 4. Resultados del desarrollo bacteriano del hisopo I			
Cuenta general	Bacterias Gram negativas	Bacterias Gram positivas	Hongos
665×10^6 UFC/ml	56×10^6 UFC/ml	25×10^6 UFC/ml	*Sd

*Sd= Sin desarrollo.

Cuadro 5. Resultados del desarrollo bacteriano del hisopo II			
Cuenta general	Bacterias Gram negativas	Bacterias Gram positivas	Hongos
$4,000 \times 10^6$ UFC/ ml	380×10^6 UFC/ml	226×10^6 UFC/ml	*Sd

*Sd= Sin desarrollo.

Cuadro 6. Resultados del desarrollo bacteriano del hisopo III			
Cuenta general	Bacterias Gram negativas	Bacterias Gram positivas	Hongos
300 X 10 ⁶ UFC/ml	65 X 10 ⁶ UFC/ml	150 X 10 ⁶ UFC/ml	*Sd

*Sd= Sin desarrollo.

Cuadro 7. Resultados del desarrollo bacteriano del hisopo IV			
Cuenta general	Bacterias Gram negativas	Bacterias Gram positivas	Hongos
28 X 10 ⁶ UFC/ ml	200 X 10 ³ UFC/ml	*Sd	*Sd

*Sd= Sin desarrollo.

4.6.2 Realización de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias.

Para la identificación de bacterias, una vez que se obtiene el cultivo puro, una colonia es sembrada en medios para bioquímica:

- Triple azúcar de hierro (TSI)^h
- Motilidad, indol, producción de ácido sulfhídrico (SIM)^h
- Citrato de Simmons^h
- Lisina de hierro (LIA)^h
- Urea^h

4.6.3 Bacterias identificadas.

Cuadro 8. Bacterias identificadas por pruebas bioquímicas	
Hisopo I	<i>Citrobacter freundii</i>
Hisopo II	<i>Proteus vulgaris</i>
Hisopo III	<i>Enterobacter cloacae</i>
Hisopo IV	<i>Escherichia coli</i>

ESTANCIA REALIZADA EN UNA EMPRESA DEDICADA A LA PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS PARA AVES EN EL ÁREA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD.

La estancia en este laboratorio comprendió del 4 de diciembre del 2006 al 16 de febrero del 2007.

Las actividades realizadas fueron las siguientes:

1. Preparación de medios de cultivo.
2. Toma de muestras de sangre para la preparación de eritrocitos al 2%.
3. Pruebas de esterilidad.
4. Pruebas de estabilidad de emulsión de vacunas.
5. Pruebas de calidad de la emulsión de vacunas.
6. Titulación de virus: Enfermedad de Newcastle, Influenza Aviar y Bronquitis infecciosa.

1. Preparación de medios de cultivo.

En el área de Aseguramiento de la Calidad se preparan los siguientes medios de cultivo:

- a) Agar infusión cerebro corazón (AICC)^h
- b) Agar verde brillante (VB)^h
- c) Agar soya tripticaseína (TSA)^h
- d) Agar dextrosa sabouraud (SDA)^h
- e) Agar Mac Conkey (McC)^h
- f) Agar sal y manitol (MSA)^h
- g) Caldo tioglicolato (CT)^h
- h) Caldo soya tripticaseína (CS)^h

De estos medios de cultivo solo se utilizan en el área de aseguramiento de la calidad, el caldo tioglicolato, caldo soya tripticaseína, agar infusión cerebro corazón (AICC) y agar dextrosa sabouraud (SDA), los demás son preparados para uso del área de producción.

Los medios de cultivo se preparan (según instrucciones de la etiqueta de cada frasco) de acuerdo al instructivo de cada uno de ellos. Los medios deshidratados se pesan en una balanza, posteriormente se hidratan con agua bidestilada y se esterilizan. La esterilización se realiza con calor húmedo en olla de presión a 121° C por 15 minutos a 21lbs de presión.

1.1 Prueba de esterilidad de medios de cultivo.

Una vez que los medios de cultivo son esterilizados se incuban durante 24 h para observar si existe desarrollo bacteriano indicando que la esterilización del medio no fue adecuada (Figura 33 y 34).



Figura 1. Incubación a 37° C (CT y AICC) Figura 2. Incubación a 22° C (CS y SDA)

La temperatura de incubación de los medios CT y AICC es a 37° C y para los medios CS y SDA es a 22° C.

2. Toma de muestras de sangre para la preparación de eritrocitos al 2%.

2.1 Obtención de sangre. La sangre se obtiene de 3 aves de postura. El anticoagulante utilizado es citrato de sodio con una dosis de 0.1 ml de citrato de sodio por cada 1 ml de sangre. La vía de extracción se hace por vena radial (10 ml de sangre).

2.2 Preparación de eritrocitos al 2%. Una vez obtenida la sangre se homogeniza y posteriormente se centrifuga a 1,250 rpm durante 10 min. Transcurrido el tiempo, con la ayuda una pipeta Pasteur se retira el plasma y la capa flogística, vertiendo un volumen de PBS similar al que se extrae de

plasma y se centrifuga nuevamente a 1,250 rpm durante 10 min, se realizan de 2 a 3 lavados. Después de la última centrifugación, se toman 2 ml de eritrocitos con una pipeta volumétrica y se mezcla suavemente con 98 ml de PBS, para obtener finalmente glóbulos rojos al 2%.

3. Pruebas de esterilidad.

Durante la estancia se tuvo la oportunidad de realizar pruebas de esterilidad en 40 lotes de vacunas emulsionadas. La prueba tiene como finalidad detectar la presencia de microorganismos viables mediante el uso de medios de cultivo generales y selectivos. Las pruebas se llevan a cabo usando bata, cofia y cubre bocas, bajo una campana de flujo laminar y mechero.

A los productos a los cuales se les aplica la prueba de esterilidad son: fluido de cosechas de líquido alantoideo inactivado de embriones infectados con el virus de Influenza Aviar, enfermedad de Newcastle, Bronquitis infecciosa, al suero de caballo y suero de pollo, así como al producto terminado como son vacunas y diluentes (Figura 35 y 36).

3.1 Prueba de esterilidad para suero de caballo, suero de pollo, diluentes y vacunas emulsionadas.

Esta prueba se realiza dentro de una campana de flujo laminar previamente desinfectada al 70% y los medios que se utilizan son CT y CS.

El CT es un medio recomendado para pruebas de esterilidad de biológicos, porque permite el desarrollo de microorganismos aerobios, anaerobios y microaerofílicos. El CS es utilizado particularmente para la detección de contaminación con bacterias aerobias y hongos.¹⁷



Figura 3. Suero de caballo.



Figura 4. Diluentes.

De los sueros se toma una muestra de 1 ml de cada frasco y se siembran en CT y CS, posteriormente se incuban por 14 días. Esto se realiza cuando llegan las muestras al laboratorio ya que estos no se producen en la empresa, posteriormente se congelan hasta el momento de su uso.

En el caso de las vacunas emulsionadas las muestras se toman de un cuarto frío donde se almacenan las vacunas después del proceso de llenado en el área de producción. El número de muestras es de 20 vacunas por cada lote de 2,000 piezas.

3.1.2 Método.

En el área de aseguramiento de la calidad, dentro de una campana de flujo laminar, 10 de 20 frascos de vacunas se desinfectan (en la boca de cada uno) con alcohol al 70%, se retira la tapa de aluminio y el tapón de plástico de cada vacuna y con una jeringa se toman 2 ml de vacuna, se inoculara 1 ml en un tubo de 35 ml de CT y 1ml de vacuna en un tubo de 35 ml de CS (Figura 37). Éste procedimiento se realiza en cada una de las vacunas, también en diluentes y sueros, posteriormente los medios se etiquetan con el número de lote y se incuban.

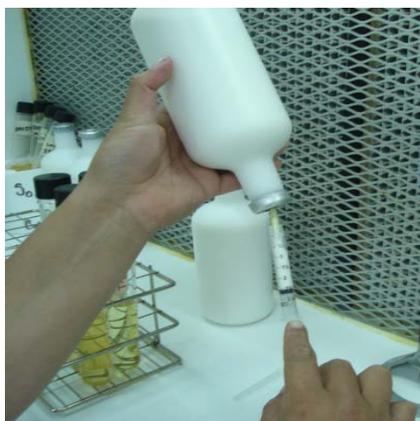


Figura 5. Toma de muestras de una vacuna.

En el caso del CT la temperatura de incubación es 37° C y CS se incuban a 22° C durante 14 días con revisión diaria, para determinar la esterilidad o la contaminación, la cual se distingue por turbidez en los medios en cualquier momento de la incubación.

Una vez terminado el procedimiento de toma de muestras de vacuna, los frascos se vuelven a tapar con tapón de hule estéril y retapa de aluminio, regresando 8 muestras al cuarto frío del área de producción y 2 se conservan en refrigeración a 4° C como muestras de retención en el área de aseguramiento de la calidad. A éstas 2 muestras se les extrae aproximadamente 100 ml de vacuna y se dividen en 2 viales de 50 ml cada uno, posteriormente uno de estos se refrigera a 4° C y el otro se incuba a 37° C por 14 días para observar que no haya separación de fases de la emulsión.

Cuando en los medios de cultivo se observa turbidez, se procede a tomar nuevamente una muestra de vacuna y se siembra tanto en medios líquidos y medios sólidos (AICC y SDA). Se incuban a 37° C y 22° C respectivamente. De esta manera se descarta la contaminación durante el procedimiento.

3.2 Prueba de esterilidad para líquido alantoideo cosechado de embriones infectados con el virus de Influenza Aviar, Enfermedad de Newcastle y Bronquitis Infecciosa.

El líquido alantoideo cosechado (cosecha) se encuentra en recipientes de 20 ó 40 L divididos por lotes dependiendo de la fecha de cosecha del fluido.

3.2.1 Toma de muestra de la cosecha.

Dentro de una campana de flujo laminar, se toman 10 ml de cosecha de cada contenedor por separado mediante el uso de una pipeta volumétrica y se siembran de 100 a 200 μ l de cada cosecha en cajas conteniendo AICC y SDA en el centro de la caja (Figura 38). Las cajas se incuban a 37° C y 22° C respectivamente.

Las cajas permanecen de 24 a 48 h en incubación y se revisan diariamente.

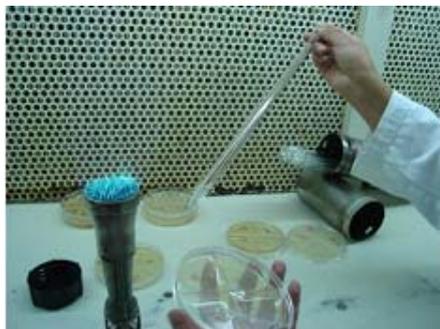


Figura 6. Siembra en los medios de AICC y SDA.

3.2.2 Aceptación y rechazo de cosechas.

Cuando en los medios de cultivo no se observa desarrollo de bacterias ni hongos, en cada contenedor se coloca una etiqueta con la leyenda de “aceptado”. En el caso de que los medios presenten contaminación se coloca una etiqueta con la leyenda de “rechazado” el que posteriormente es eliminado y destruido según la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

4. Prueba de estabilidad de la emulsión de vacunas.

Esta prueba consiste en centrifugar una muestra de las vacunas (5 ml) a 3,500 rpm durante 30 min. Transcurrido el tiempo se observa la muestra, ésta no debe presentar separación de fases. En el caso de haber presentado separación de fases se informa al químico responsable para su posterior rechazo y búsqueda de la falla y solución del proceso de emulsificación.

5. Prueba de calidad de la emulsión de vacunas.

La calidad de la emulsión se determina colocando 2 ml de vacuna en 2 ml de agua y 2 ml de vacuna en 2 ml de aceite mineral.

Interpretación: La muestra de vacuna debe mezclarse en aceite, no así en agua. Si ocurre lo contrario se informa al químico responsable debido a que el proceso de emulsificación no ha sido el correcto.

6. Titulación de virus: Enfermedad de Newcastle, Influenza Aviar y Bronquitis Infecciosa.

El título viral se define como el número de dosis infectivas por volumen inoculado, una dosis infectiva se define como la mínima cantidad de virus que produce un efecto reconocible en el sistema huésped empleado.¹⁸

6.1 Determinación del título del virus de la Enfermedad de Newcastle, Influenza Aviar.

El título se determina en dosis infectantes embrión de pollo al 50%/ ml de las cosechas del virus de la Enfermedad de Newcastle cepa La Sota e Influenza Aviar subtipo H₅ N₂.

Las muestras se obtienen de líquido alantoideo cosechado de embriones infectados con el virus de Newcastle cepa La Sota e Influenza Aviar subtipo

H₅ N₂ que se encuentran en recipientes de 20 L. El volumen de cada muestra es de 10 ml colectándose de forma estéril dentro de una campana de flujo laminar en viales de 50 ml y se mantienen en refrigeración (4 a 8° C) hasta su titulación, ésta no debe ser mayor a 8 h.

6.1.1 Procedimiento.

Se utilizan 20 embriones de aves libres de patógenos específicos de 9 a 11 días de edad por cada lote de virus cosechado, se verifica que los embriones sean viables utilizando un ovoscopio y se delimita el punto de inoculación, (3 a 5 mm por arriba de la cámara de aire), en este caso la inoculación se realiza por cavidad corioalantoidea (Figura 39). La elección de la ruta de inoculación y la edad del embrión, son determinadas por la selectividad del virus hacia una determinada membrana o estado de desarrollo del embrión.¹⁸

Posteriormente se identifican cada uno de los huevos embrionados a utilizar por cada dilución y se desinfectan con yodo al 2% (Figura 40).



Figura 7. Revisión de la viabilidad del embrión.



Figura 8. Desinfección con yodo al 2%.

Se realizan diluciones décuples de 10^{-1} a 10^{-10} de la muestra en 9 ml de PBS y antibiótico, (penicilina estreptomycin al 1%) dentro de la campana de flujo laminar.

El cascarón de cada embrión se perfora en el punto de inoculación, suministrando 0.2 ml de cada dilución vía cavidad alantoidea con jeringa de 1 ml y se sellan con pegamento blanco (Figura 41 y 42).

La incubación se lleva a cabo a una temperatura de 37° C por 3 a 5 días determinando la viabilidad de los embriones con el ovoscopio diariamente y registrando la mortalidad. Los embriones muertos a las 24 h post inoculación son descartados. La prueba se realiza por duplicado.



Figura 9. Inoculación en cavidad alantoidea.



Figura 10. Sellado del orificio de inoculación.

6.1.2 Prueba de hemoaglutinación rápida en placa.

Transcurridas 72 h los embriones se refrigeran al menos 30 minutos antes de su cosecha, posteriormente se corta el cascarón a nivel de la cámara de aire iniciando por la dilución más alta, se colecta el líquido alantoideo (0.05 ml) de cada embrión por separado y se deposita en una placa de vidrio, se coloca la misma cantidad de una solución de eritrocitos al 2% sobre la muestra y se mezcla mediante movimientos oscilatorios cada muestra.

Interpretación de resultados. Se considera positivo cuando se observa hemoaglutinación en la superficie de la placa (Figura 43 y 44).



Figura 11. Hemoaglutinación



Figura 12. Hemoaglutinación

positiva.

negativa.

Ejemplo:

Obtención de título mediante la fórmula de Reed and Muench.							
Dilución		+	-	Σ +	Σ -	Total	%
10 ⁻¹⁰	0/5	0	5	0	9	0/9	0
10 ⁻⁹	2/5	2	3	2	4	2/6	<u>33</u>
10 ⁻⁸	4/5	4	1	6	1	6/7	<u>85</u>
10 ⁻⁷	5/5	5	0	11	0	11/11	100

$$D_p = \frac{\% > 50\% - 50}{\% > 50\% - \% < 50\%} = \frac{85 - 50}{85 - 33} = \frac{35}{52} = 0.6$$

Donde:

Dp = Distancia proporcional.

Por lo tanto:

$$10^{8.6+0.7} = 10^{9.3} \text{ Título} = 10^{9.3} \text{ DIEP } 50\%/ml$$

Cuando la mortalidad de los embriones de cada dilución, así como de los controles es mayor al 20% la prueba se repite.

El título se reporta en Dosis Infecciosa Embrión de Pollo (DIEP 50%/ml).¹⁹

Se realiza la prueba de hemoaglutinación de la muestra 10⁻⁰ solo para descartar virus extraños.

6.2 Determinación del título del virus de Bronquitis infecciosa.

El procedimiento para la titulación del virus de bronquitis infecciosa es similar a lo descrito anteriormente, sin embargo las diluciones inoculadas van de 10⁻⁵ a 10⁻⁸ y se colocan 6 embriones sin inocular que servirán como control negativo. Después del periodo de incubación de 7 días se realiza la lectura (los embriones muertos a las 24 h post inoculación son descartados).

Los embriones se colocan en refrigeración aproximadamente 30 min antes de observarse, posteriormente se corta el cascarón a nivel de la cámara de aire extrayéndose los embriones para colocarlos en una charola. Los embriones control se comparan con los embriones inoculados (Figura 45).



Figura 13. Comparación de embriones control y embriones inoculados con el virus de Bronquitis Infecciosa.

6.2.1 Interpretación de resultados.

Se considera positivo cuando el embrión presenta lesiones características de bronquitis infecciosa como: enanismo, enrollamiento del embrión, deformación de patas, presencia de uratos en mesonefros.²⁰

El número de embriones positivos se registra contra el número de embriones inoculados y el título es obtenido mediante la fórmula de Reed and Muench.

MUESTREO CUANTITATIVO DE CHAPAS DE PUERTAS EN EL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL AVES.

Durante la estancia en el DPAA, también se realizó un muestreo de chapas de puertas para continuar con su procesamiento.

1. Material.

- Solución de agua con detergente comercial (surfactante aniónico)
- Cloro al 13 %
- Fibra
- Agua
- Hisopos estériles
- Guantes
- Tubos de vidrio
- Medios de cultivo utilizados: TSA, McC y MSA.
- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)
- Pipetas de 1 ml y 20 μ l
- Agitador

2. Desinfección de las chapas de las puertas.

Se realizó un lavado de las chapas con agua y con jabón, posteriormente se dejó secar y se colocó una solución clorada al 13%, posteriormente se dejó secar por ambos lados de las puertas.

3. Toma de muestra.

Se tomó un hisopo embebido en PBS estéril y se pasó por todo el contorno de la chapa. El muestreo se realizó en las chapas interiores y exteriores de los sanitarios. Las muestras se conservaron en refrigeración a 4° C hasta su procesamiento.

4. Procesamiento de la muestra.

En la misma forma que lo descrito para la técnica de Gentry y el mismo procedimiento se repitió 24 h después pero sin desinfectar las chapas obteniendo 2 clases de muestras, con desinfección y sin desinfección.

5. Resultados.

5.1 Chapa externa de sanitario de hombres (con desinfección).

No se observó desarrollo de colonias en los medios de TSA, MSA y McC a las 24 y 48 h post inoculación.

5.2 Chapa externa de sanitario de hombres (sin desinfección).

Se obtuvo 100 UFC/ml en cuenta general, en los medios de MSA y McC no hubo desarrollo de colonias.

5.3 Chapa interna de sanitario de hombres (con desinfección).

No se obtuvo desarrollo de colonias en ningún medio.

5.3 Chapa interna de sanitario de hombres (sin desinfección).

Se obtuvo 350 UFC/ml en cuenta general, en MSA y McC no hubo desarrollo bacteriano.

5.4 Chapa externa de sanitario de mujeres (con desinfección).

No se observó desarrollo en los medios.

5.5 Chapa externa de sanitario de mujeres (sin desinfección).

Se obtuvo 700 UFC/ml en cuenta general, en los medios de MSA y McC no hubo desarrollo de colonias.

5.6 Chapa interna de sanitario de mujeres (con desinfección).

No se observó desarrollo bacteriano en ningún medio.

5.7 Chapa interna del sanitario de mujeres (sin desinfección).

Se obtuvo 33 UFC/ml en cuenta general, en los medios de MSA y McC no hubo desarrollo de colonias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Unión nacional de avicultores. [Página de Internet] México: La asociación 2007 [actualización 2007Marzo 8; citado 2005] Tomado de: http://www.una.org.mx/inindex.php?option=com_content&task=view&id=18&Itemid=27
2. Velladares de la C J C. Puntos críticos para el envío de muestras y la interpretación. Memorias de las IX jornadas médico avícolas. México. UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2003.
3. Cork, SC. The veterinary laboratory and field manual: a guide for veterinary laboratory technicians and animal health advisors / S.C. Cork, R.W. Halliwell Nottingham, U.K: Nottingham University, 2002.
4. Fossum, TW. Cirugía en pequeños animales. 2ª ed. Buenos Aires: Intermédica, 2004.
5. Pérez JA. Bacteriología general. Principios químico biológicos. México: UNAM, 1990.
6. Cambell T. Avian hematology and cytology. Iowa State University.1995
7. Gregg LV. Conceptos y técnicas hematológicas para técnicos veterinarios. España: Acribia, 2000.
8. Banks WJ. Histología veterinaria aplicada. México: Manual moderno, 1996.
9. Aluja, SA de Constantino CF. Técnicas de necropsias en animales domésticos. 2ª ed. México: Manual moderno, 2002.
10. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobón L. Métodos histotecnológicos. Instituto de patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, Washington DC, Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 1995.
11. Gartner L. Hiatt JL. Texto y atlas de histología. 2ª ed. México: Mc Graw-Hill, 2002.

12. Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología veterinarias. México. Departamento de microbiología e inmunología. UNAM. FMVZ, 1999.
13. Gentry RF. The measurement of bacterial contamination on egg shells. Poultry Science 51:930-933, 1972.
14. Hilleboe HE. Manual de tratamiento de aguas. Nueva York: Limusa, 1996.
15. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
16. Quinn PJ. Concise review of veterinary microbiology. USA: Blakwell publishing, 2003
17. BBL Manual of Products and Laboratory Procedures. 5^a ed. USA: Division of Becton, Dickinson and Company, 1973.
18. Del Castillo E, Gómez AF. Manual de laboratorio. Prácticas de virología. México. UNAM. FMVZ. 2003.
19. Villegas P. Titration of biological suspensions. In: Isolation and identification of avian pathogens, 4th ed., eds. The American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. 1998.
20. King DJ, Covanagh D. Bronquitis infecciosa. En: Enfermedades de las aves. Calnek BW, Barnes J, editors. México: Manual moderno. 2003.