

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

MODALIDAD AVES: LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO

**INFORME FINAL DE TRABAJO PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

VERDE ROJO EPHRAIM

TUTOR: MVZ. MAGDALENA ESCORCIA MARTINEZ

MÉXICO DF.

2007



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.

DEDICATORIA.

Para ti Mamá (†), la escultora de mi espíritu, tu vida es maestra de la mía. El amor que me has dado es mi fuerza y mi alegría, te debo más que tanto, TODO.

A mis hermanas, sin su amor y su apoyo no se donde estaría. Cecilia por enseñarme el significado de la libertad y Diana por tu amor y protección... Gracias.

A la familia Segura – Verde. Evelyn por ser el mejor ejemplo a seguir. A Juan por ser como es y que siempre así sea.

A ti Emilio (†)... te extraño.

Alejandra eres “magna como tu corazón y tu belleza”. Tanto talento en un solo cuerpo como cabe? Más allá de eso por todo, que lindo es tenerte. Siempre abra para nosotros Cheesecake con zarzamoras.

A Nadia, Linda y Raquel por compartir conmigo una de las mejores etapas de mi vida, que seguramente estará grabada en nuestros corazones.

A Julieta, Bris y Sonia mis tres duendes.

A mis grandes amigos Omar, Ulises, Carlos, Miguel, Horacio y Daniel por cada momento dentro y fuera de clases.

Para ti Magda eres la mejor maestra que he tenido en la vida. Gracias por creer en mi; muchas gracias por hacerme sentir importante y enseñarme que yo... podía hacer la diferencia.

A los doctores Néstor Ledesma, Gabriela Gómez y Marco Juárez por mostrarme el mundo de la avicultura e inspirarme a seguirlo.

A Ramón y José que caminan siempre conmigo.

Y sobre todo a ti Katy que ya nunca más caminaras conmigo, tú me enseñaste que los chicos no lloran.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme formado profesionalmente,

A mi asesora la Dra. Magdalena Escorcía Martínez por su confianza, paciencia, enseñanzas y por estar conmigo en esta aventura. Gracias por cuidar de mi carrera tanto o más que yo mismo y por estar allí con su inteligencia y pasión.

A los miembros de mi jurado por su colaboración.

Al personal del Departamento de Producción Animal: Aves por su tiempo, apoyo y los momentos que compartí con cada uno de ustedes.

A todos aquellos que contribuyeron con su tiempo y conocimientos para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	Página
Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Contenido.....	iii
Resumen.....	1
Flujograma de actividades.....	2
Introducción.....	3
Flujograma de la distribución de la muestra.....	4
Objetivos.....	5
Área de lavado.....	6
Recepción de casos clínicos.....	12
Toma y envío de muestras.....	14
Patología.....	15
Área de bacteriología.....	22
Área de virología.....	34
Área de serología.....	42
Entrega de resultados.....	47
Caso clínico.....	48
Bibliografía.....	53

Resumen

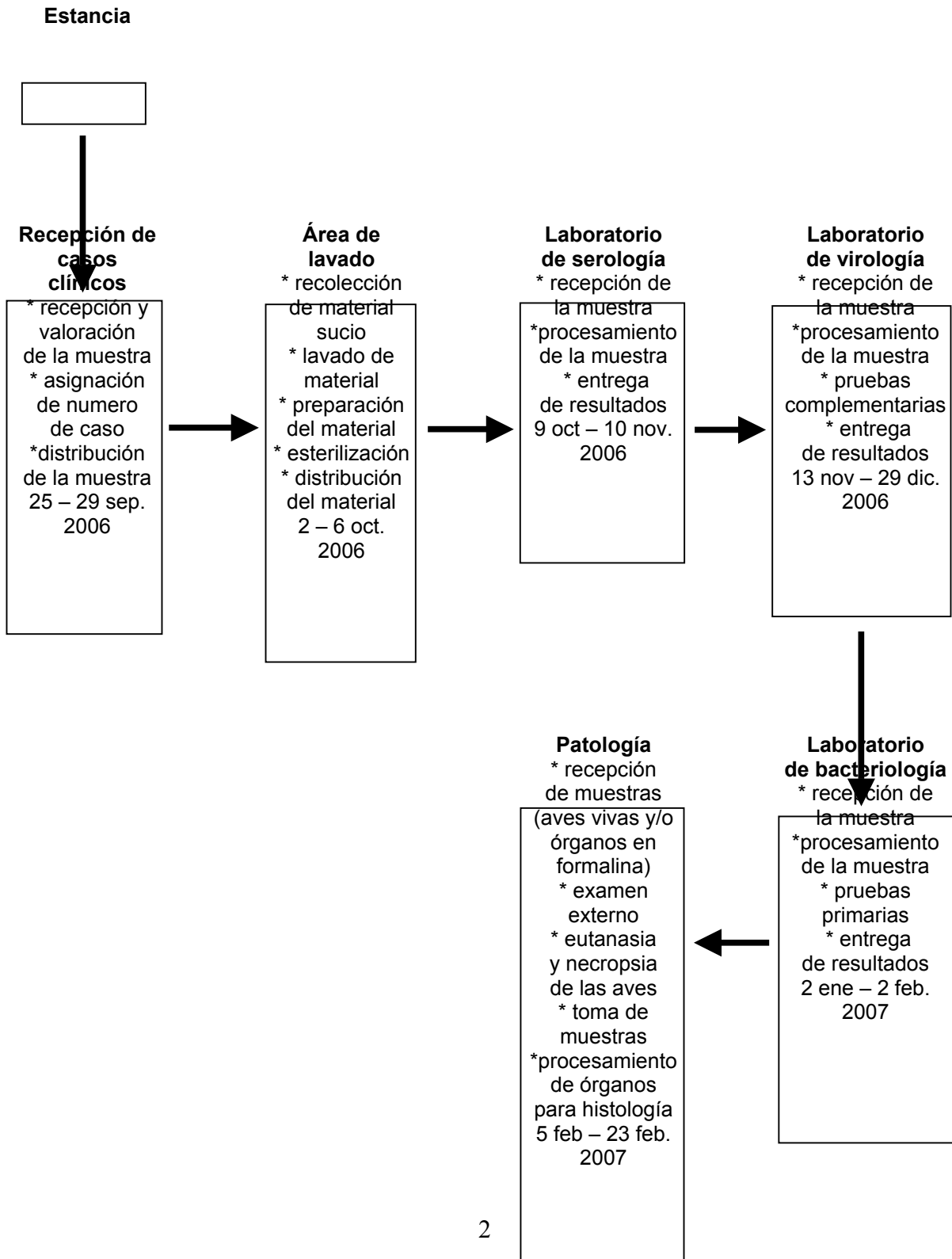
El Trabajo Profesional, a través de su modalidad en Laboratorio de Diagnóstico, tuvo una duración de 20 semanas; inició el 25 de septiembre del 2006 y concluyó el pasado 23 de febrero del 2007. Las prácticas para la realización de esta modalidad se llevaron a cabo en una empresa privada cuyo objetivo es el diagnóstico de enfermedades en la industria pecuaria. La estancia en cada uno de los laboratorios que conforman esta empresa tuvo una duración aproximada de 5 semanas.

En cada una de las áreas hay un médico veterinario responsable que se encargó de mostrarme las técnicas correspondientes a cada laboratorio así como los fundamentos generales de las mismas, realizó la supervisión del trabajo y evaluó mi desempeño en el área, con la finalidad de corregir y mejorar los puntos en los que presenté deficiencias.

Al finalizar mi estancia en cada uno de los laboratorios a los que fui asignado pude entender la importancia que tiene cada uno y en conjunto como una herramienta de apoyo para el diagnóstico de enfermedades en las aves.

El desarrollo de mis actividades fue como se describen en el flujograma que se adjunta en la siguiente página, en cada cuadro se citan las actividades que realicé en cada área, así como los periodos en que permanecí en cada una de ellas.

FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES DESARROLLADAS



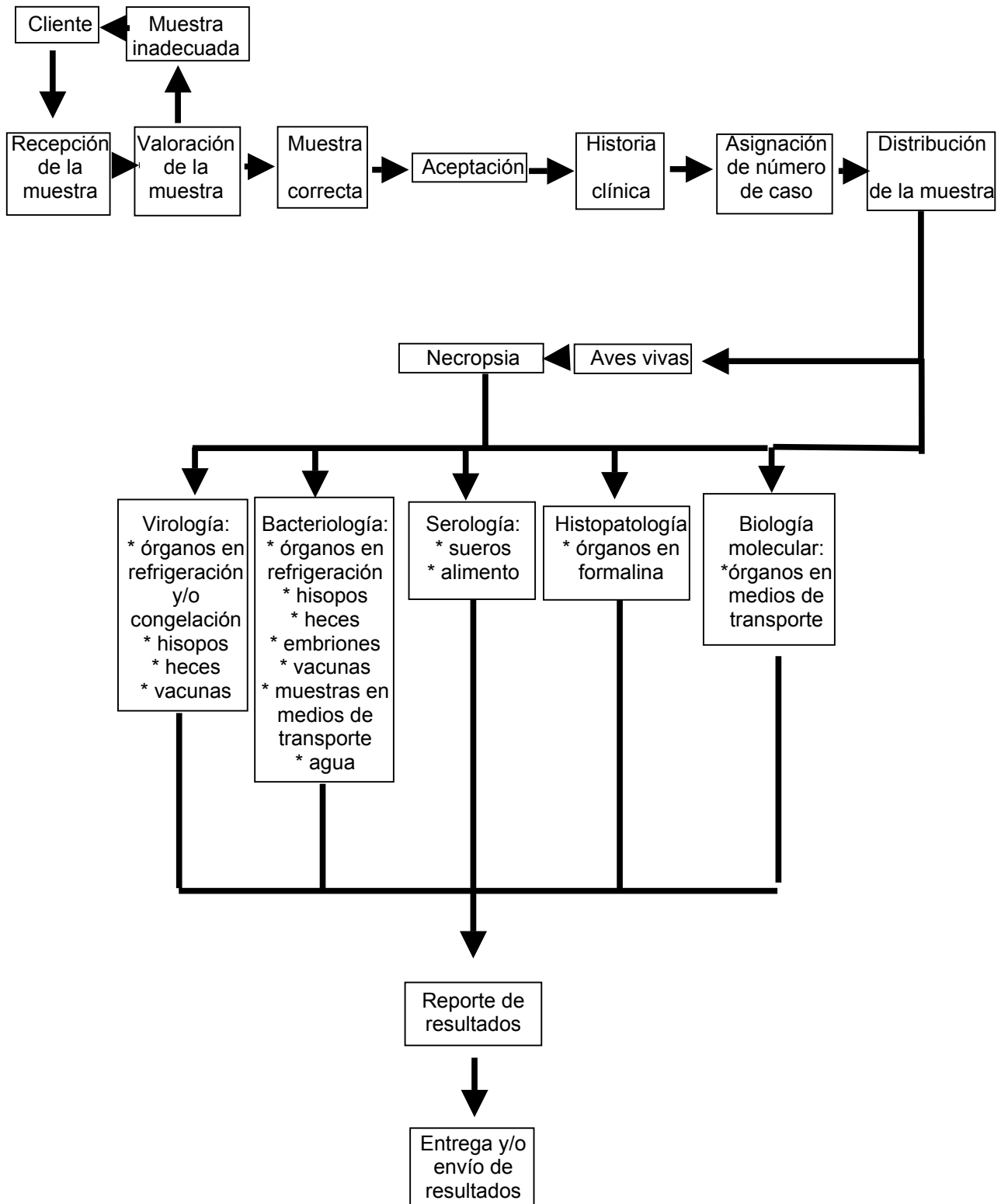
Introducción

La empresa privada de diagnóstico en la que realicé mi estancia de veinte semanas, es una empresa creada en 1987 por un grupo de inversionistas, con la intención de apoyar a la industria pecuaria brindando información clínica veraz y oportuna, para estructurar de manera inteligente estrategias de prevención y control de las enfermedades que afectan a los animales, y de esa manera, impulsar la competitividad y el éxito de la empresa pecuaria.

Esta empresa cuenta con personal capacitado en cada una de las áreas operativas, con equipo actualizado, técnicos y tecnologías estandarizadas y validadas tanto por autoridades nacionales como por normas internacionales. Se brinda un servicio de diagnóstico especializado y actualizado en técnicas diagnósticas de apoyo a la industria pecuaria ofreciendo resultados oportunos y con una atención personalizada. Se encuentra constituida por las áreas de serología, virología, bacteriología, biología molecular, histopatología y toxicología de alimentos (micotoxinas), áreas en las que se cuenta con la capacidad de realizar pruebas diagnósticas de las enfermedades que se presentan en las explotaciones pecuarias. Además se genera información sobre el estado epidemiológico que guardan las diferentes enfermedades de los animales respaldando las campañas zoonosanitarias que actualmente se llevan a cabo en nuestro país.

El trabajo que se realiza en esta empresa debe seguir un flujo estricto para alcanzar con éxito el resultado final, para ello es importante citar en este punto el flujograma desde que se recibe la muestra hasta que se envían los resultados.

FLUJOGRAMA DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA



Objetivos

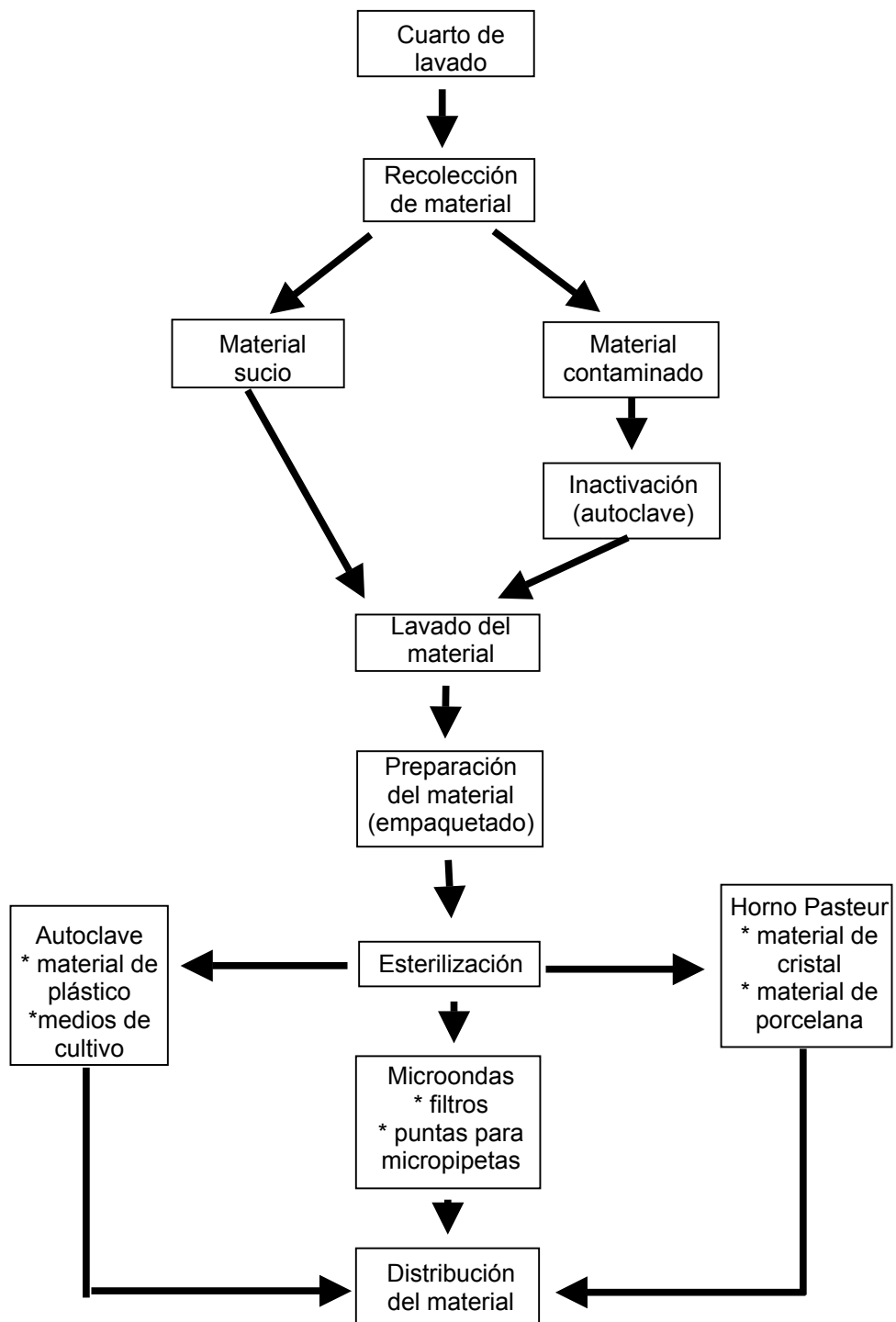
Objetivo General

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.

Objetivos Específicos

- Obtener los conocimientos y habilidades adecuadas para realizar necropsias, tomar y enviar correctamente muestras para las áreas de serología, parasitología, virología, bacteriología, hematología e histopatología que conforman el laboratorio de diagnóstico.
- Realizar una estancia de cuatro semanas de duración en cada una de las secciones que conforman la empresa privada donde se realizará el trabajo profesional.
- Obtener los conocimientos y habilidades adecuadas para integrar los resultados de laboratorio y llegar a un diagnóstico integral.

FLUJOGRAMA DEL ÁREA DE LAVADO Y PREPARACIÓN DE MATERIAL



ÁREA DE LAVADO Y PREPARACIÓN DE MATERIAL

Periodo de estancia

Mi estancia en el área de lavado fue del 2 al 6 de octubre del 2006.

Importancia del área

Asegurar la limpieza, desinfección y esterilidad del material utilizado para una mayor eficiencia de las técnicas realizadas.

El material utilizado en el laboratorio requiere de un procedimiento que elimine o disminuya los microorganismos con el fin de interrumpir la cadena de transmisión y ofrecer una práctica segura al realizar los métodos de diagnóstico.

La selección del procedimiento adecuado para cada artículo depende de la naturaleza de los materiales y el tipo de procedimientos a que están destinados.

LIMPIEZA (LAVADO DEL MATERIAL)

Es la remoción mecánica de toda materia extraña en las superficies de objetos inanimados. Se consigue en general con la utilización de agua y detergente. La materia orgánica e inorgánica presente en el material interfiere en los métodos de esterilización y desinfección ya sea impidiendo el contacto del agente esterilizante con todas las superficies o en el caso de procesamiento por calor, prolongando los tiempos de exposición requeridos para lograr el mismo objetivo. La limpieza disminuye la carga microbiana por arrastre pero no destruye microorganismos.¹

EMPAQUE

En esta etapa los artículos son preparados y empaquetados en condiciones que faciliten su uso y se eviten daños y deterioro del material. El empaque requerido por cada artículo depende del método de esterilización, su naturaleza y el uso a que está destinado. Deben ser permeables al método de esterilización que se utilice y resistente al almacenamiento hasta el momento de ser utilizados.¹

ESTERILIZACIÓN

Este término se emplea para describir una serie de procesos físicos y químicos que proporcionan esterilidad, entendiéndose por esto el estado que guarda un producto o material al quedar totalmente libre de microorganismos vivos.^{2,3}

Esterilización por principios físicos.

Calor

La temperatura influye directamente sobre el metabolismo celular y sobre su capacidad de sobrevivir o morir. La muerte de microorganismos se debe a que las proteínas sometidas a estas temperaturas son desnaturalizadas al romperse los enlaces de sus estructuras secundarias y terciarias. Este fenómeno hace que las fibras separadas se hagan menos solubles y los líquidos se tornan más viscosos y turbios, culminando en un proceso de coagulación. Bajo estas circunstancias se pierden las actividades funcionales de dichas proteínas, como lo es su propiedad enzimática. La aplicación de calor representa uno de los mecanismos más importantes para el proceso de esterilización. Se puede realizar utilizando calor húmedo o calor seco.³

Calor húmedo

Métodos de esterilización.

- Ebullición. Durante siglos se ha considerado importante la ebullición para reducir los peligros de adquirir enfermedades mediante la ingestión de agua y alimentos contaminados. En la práctica se recurre con frecuencia a la ebullición para esterilizar jeringas, agujas, frascos y otros instrumentos, cuando no se cuenta con autoclave. Las formas no esporuladas o vegetativas se destruyen a temperaturas de ebullición en 10 minutos. Sin embargo para destruir la mayoría de las formas esporuladas es necesario mantener la ebullición por lo menos 30 minutos, teniendo en cuenta que algunas esporas pueden resistir la ebullición incluso por horas.³
- Autoclave. La aplicación de calor húmedo combinado con otros factores como son la presión y el tiempo, han originado uno de los equipos más efectivos para la esterilización, el autoclave. Este consiste en un aparato de metal conteniendo una doble cámara, en la cámara interna se colocan los materiales que serán esterilizados. El aparato cierra herméticamente, teniendo manómetros y válvulas que permiten controlar la presión. Al aumentar el vapor en la cámara interna, aumenta la presión y en relación directa con esta hay un incremento en la temperatura. Al alcanzar

una presión de 15 lb. Se obtiene una temperatura de 121°C la cual debe mantenerse por 15 min. para una adecuada esterilización. Es importante desplazar el aire de la cámara de esterilización con vapor de agua, por lo que la válvula de purga debe mantenerse abierta hasta el momento en que empieza a salir vapor, ya que el aire no tiene capacidad de esterilización aún cuando se encuentre comprimido, mientras que el vapor comprimido propicia la hidratación y por ende la desnaturalización y coagulación de proteínas.^{2,3}

Calor seco

Métodos de esterilización.

- Esterilización en horno Pasteur. Los primeros indicios sobre esterilización con calor seco en horno corresponden a Koch y Wolffhiigel en 1881. La desnaturalización y coagulación de proteínas en ausencia de humedad requieren de temperaturas muy elevadas. Bacterias en su forma vegetativa son muertas a temperaturas de 100°C en hora y media, mientras que las formas esporuladas deberán permanecer 3 horas a 140°C. Este tipo de esterilización es usado para el material de cristalería e instrumentos de metal.¹
- Flameado directo. Otra forma de esterilización por calor seco es el flameado directo. Generalmente se usa en material de vidrio y metal.¹
- Incineración. Es el método empleado para la destrucción de materiales contaminados, especialmente cadáveres y tejidos.³

Filtración

El uso de filtros para la esterilización es de gran importancia ya que existen soluciones que no pueden ser esterilizadas por calor, sin que sufran una importante alteración en sus propiedades fisicoquímicas.³

- Filtro Seitz o filtro de asbesto. Este consta de asbesto prensado en discos de poco espesor y es colocado en una rejilla de metal, sujeta por tres abrazaderas de rosca en un portafiltro. El líquido a filtrar se aloja en la vasija de la parte superior y por medio de presión al vacío se pasa a través del filtro.³

- Filtro de porcelana. Estos consisten en cilindros de porcelana sin barnizar que están compuestos de: silicato de aluminio y arena de cuarzo.³
- Filtros de vidrio. Se preparan a partir de vidrio finamente molido el cual se pone en un molde en forma de disco y se calienta para hacer que las partículas se adhieran.³
- Filtros de membrana. Estos filtros están constituidos por material polimérico de diferentes compuestos como esterres de celulosa (acetato de celulosa y nitrato de celulosa). Una característica muy importante es que ofrecen una masa de material polimérico cuyos poros poseen diámetros muy homogéneos.³

Radiaciones

Existen dos tipos de radiaciones, radiaciones de onda larga (no ionizantes) y radiaciones de onda corta (ionizantes). Ambos tipos se pueden utilizar con fines de esterilización y desinfección.^{1, 2}

- Radiaciones de onda larga. Se refieren a radiaciones con una longitud de onda de 200 – 295 nm por lo que son ondas no comprendidas en el espectro visible. Las radiaciones ultravioleta pertenecen a este grupo. No poseen capacidad ionizante pero son capaces de penetrar al interior de la célula causando fenómenos que influyen directamente sobre los procesos de replicación del ADN. El daño sobre el ADN consiste en la formación de puentes de enlaces covalentes entre pirimidinas con la formación de dímeros de timidina. Estos dímeros cambian la forma del ADN y no hay apareamiento de bases y por lo tanto se altera su replicación y síntesis.^{1, 2, 3}
- Radiaciones de onda corta. Se dividen en dos grupos, radiaciones por partículas las cuales incluyen a los rayos catódicos con los electrones de alta energía y radiaciones electromagnéticas que incluyen a los rayos X y gamma. El efecto de las radiaciones ionizantes en organismos vivos depende de la cantidad de energía absorbida por estos. Al paso de las radiaciones a través de la materia, la partícula ionizante choca con los protones del núcleo de los átomos y se transfiere energía a un electrón

orbital. El electrón es disparado del átomo con alta energía y a gran velocidad, saliendo de su orbita y chocando con nuevos átomos a los que a su vez ioniza. ^{1, 2, 3}

Los efectos de las radiaciones ionizantes se dividen en dos:

- Directo. Esta dado por la transferencia de energía de estas. Este efecto no es muy importante; sin embargo puede causar la ruptura de enlaces de hidrógeno en el ADN.
- Indirecto. Consiste en la ionización del agua

Esterilización por principios químicos o desinfección.

Cuando se utilizan agentes químicos por lo general se habla de desinfección. Estos agentes en su mayoría no tienen un efecto esterilizante pero destruyen virtualmente todos los microorganismos patógenos. Solo algunos desinfectantes pueden tener efecto esterilizante cuando se usan apropiadamente como: formaldehído, el fenol, gluteraldehído, óxido de etileno y el peróxido de hidrógeno. ^{1, 2}

El término desinfección puede definirse como la acción de restar a una población de agentes patógenos su potencial infeccioso. Estrictamente hablando, la desinfección se aplica a objetos inanimados. Existen algunos desinfectantes que no causan daño tisular y por lo tanto pueden aplicarse sobre superficies corporales, a éstos se les conoce como antisépticos. La antisepsia es la acción de eliminar microorganismos patógenos directamente de los tejidos vivos. Como ejemplos tenemos el alcohol etílico, yodo, cloruro de benzal, etc. ^{1, 2}

Mecanismos de acción de los agentes químicos.

En forma general podemos decir que los desinfectantes actúan por inducción de cambios químicos en diferentes componentes de las células bacterianas ya sea causando daño a nivel de la membrana celular, afectando la organización de dicha estructura, así como sus funciones, propiciando la salida de metabolitos y lisis celular o la desnaturalización y modificación de los grupos funcionales de las proteínas. ³

RECEPCIÓN DE CASOS CLÍNICOS

Mi estancia inició el 2 de octubre de 2006 y concluyó el 6 de octubre de 2006. Esta es una de las áreas de mayor importancia ya que en ella se lleva a cabo la evaluación de la muestra para poder ser registrada y posteriormente ser distribuida a los respectivos laboratorios.

En el caso del área de aves se reciben desde aves vivas, órganos, muestras de sueros, heces, hisopos, alimento, vacunas, etc. Estas muestras provienen de aves en producción, aves de ornato y compañía así como de empresas dedicadas a la elaboración de productos biológicos.

La evaluación de la muestra se realiza observando que se encuentre identificada y con los datos del cliente, que se reciba en las condiciones adecuadas dependiendo del área y del estudio que se solicita y que se encuentre acompañada de su historia clínica correspondiente.

Importancia del diagnóstico

Para realizar en forma eficiente el control o erradicación de una enfermedad, es imprescindible realizar el diagnóstico preciso y oportuno de la misma. El advenimiento de nuevas tecnologías y sistemas de operación de las explotaciones pecuarias han propiciado cambios importantes en la presentación de las enfermedades. Constantemente se identifican nuevos agentes etiológicos y por lo tanto nuevas enfermedades y combinación entre ellas, debido a esto el diagnóstico clínico es cada vez más difícil ya que la similitud de signos ha aumentado la confusión entre ciertas enfermedades.⁴

Para poder orientar nuestro diagnóstico el primer paso es la realización de una historia clínica y el registro cuidadoso de los signos observados en las aves enfermas y las lesiones que se vean a la necropsia, lo que permitirá saber qué muestras deben colectarse y qué pruebas de laboratorio deben llevarse a cabo.⁴

Para hacer una historia clínica completa deberán incluirse los siguientes datos:

- Anamnesis. El interrogatorio debe incluir preguntas sobre información básica de la explotación y el sistema de producción, así como preguntas dirigidas al problema específico.^{4,8}

- Análisis de registros. Indican la tendencia de los distintos parámetros en el tiempo, lo cual es una guía para el análisis global del problema. ^{4, 8}
- Inspección física de la explotación pecuaria. Al realizar ésta se hacen observaciones de instalaciones, manejo zootécnico y eficiencia del personal para identificar factores predisponentes y ayudarnos así no solo al diagnóstico, sino al control del problema. ^{4, 8}
- Realización de la necropsia. El realizarla rutinariamente permite identificar con mayor facilidad los problemas existentes en la explotación. ^{4, 8}
- Inspección en el rastro. Es de gran utilidad cuando se desean evaluar enfermedades subclínicas que difícilmente pueden detectarse en la explotación o mandando uno o dos animales al laboratorio. ^{4, 8}

TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

La toma de muestras debe efectuarse siguiendo las instrucciones que a tal efecto se describen en los métodos analíticos, ya que constituye una parte fundamental de los mismos. Por este motivo, la toma de muestras se efectuará siempre de acuerdo con el método que vaya a ser utilizado en el laboratorio. ⁵ (Ver cuadro 1).

Cuadro 1. Toma y envío de muestras

Estudio solicitado	Muestras enviadas.	Medio de transporte	Conservación
Histopatología	Órganos parenquimatosos: bloques de 0.5 cm X 1-2 cm ² Órganos tubulares: porciones no mayores a 1 cm de longitud	Formalina al 10%.. Dilución: 1:10 si se prevé que pueda tardarse en trabajar. Dilución: 1:2 si se trabajan después de 24 horas de la toma	Se puede refrigerar, simultáneo a la toma de muestras. NUNCA CONGELAR
Serología	Suero	Refrigeración	Refrigeración o congelación
Hematología	Sangre completa	Anticoagulante (EDTA 1%, Citrato 1%)	Refrigeración. NUNCA CONGELAR
Virología	Órganos. Hisopos	PBS, Hank's, MEM o M199	Refrigeración Congelación
Bacteriología	Órganos Hisopos Huevos (Gentry)	PBS Medios de transporte: Bolsas de plástico estériles.	Refrigeración Congelación
Parasitología	Heces frescas	Dicromato de potasio 2.5% Dilución: 1:2 si se trabajan inmediatamente. 1:10 si se tardan en trabajar.	No se necesita refrigeración.
Toxicología	Alimento Cama Heces	1-2 Kg en bolsas de papel Seca de diferentes zonas. Se transportan en bolsas plásticas	No refrigerar

PATOLOGÍA

Es la ciencia encargada de estudiar la causa y desarrollo de los cambios funcionales y estructurales, que ocurren en los organismos enfermos.⁸

Necropsia

Importancia

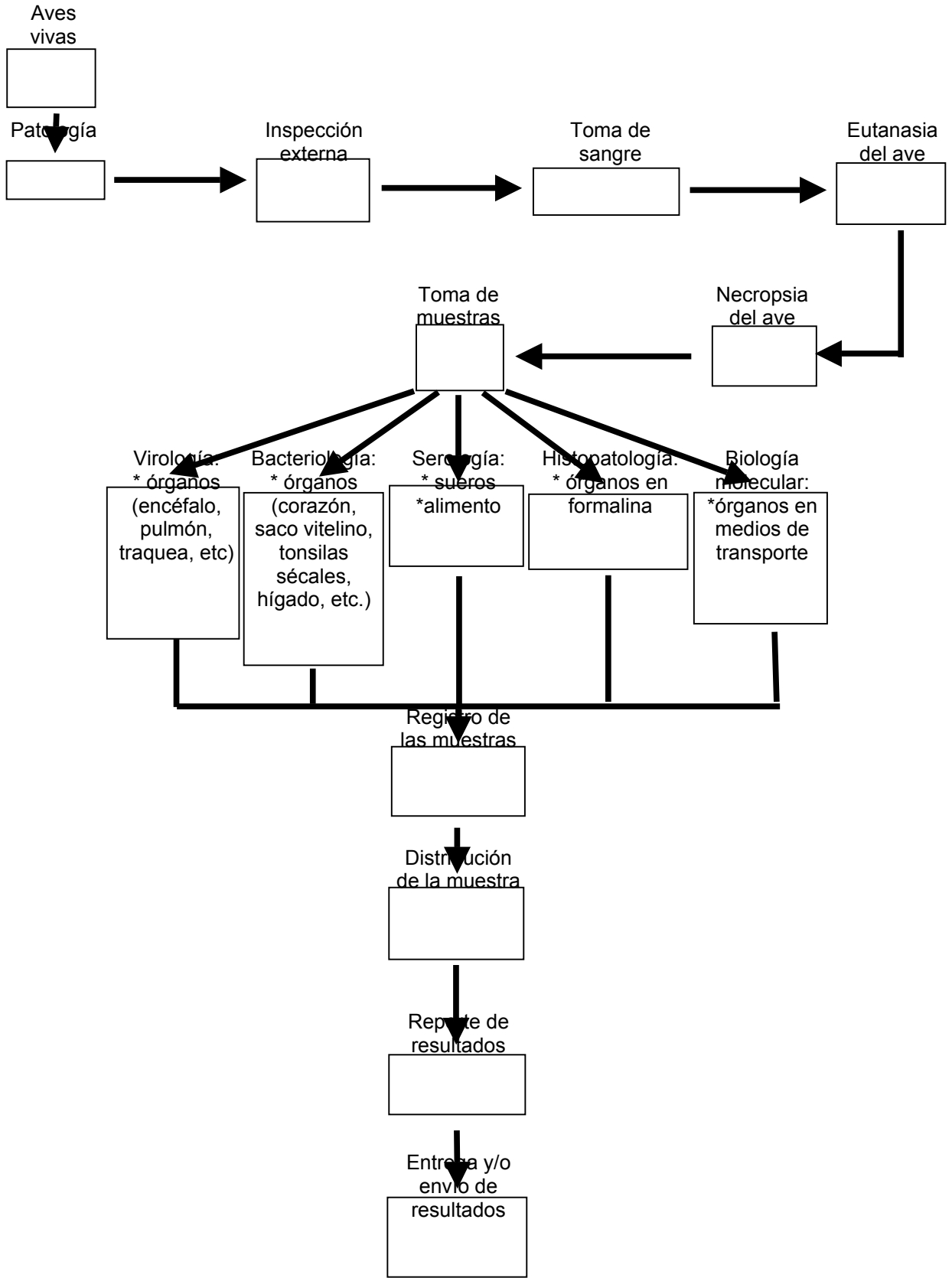
La realización de la necropsia de las aves remitidas al laboratorio, permite a través de la observación de signos clínicos, lesiones macroscópicas y de la redacción de un informe de necropsia la formulación de un diagnóstico presuntivo.⁸

Mi estancia en el área de necropsias comenzó el 5 de febrero y concluyó el 23 de febrero del año en curso.

¿Qué es y para qué sirve?

Es el procedimiento técnico y científico de la disección anatómica sistemática de un animal después de su muerte, para realizar un estudio macroscópico de los órganos y tejidos.⁸

FLUJOGRAMA DE PATOLOGÍA



Vías de sangrado

Cuando se requieren muestras de sangre para la realización de pruebas serológicas o hematológicas, es necesario realizar una toma de muestra de sangre del ave.⁵ Para seleccionar la técnica más adecuada se debe tomar en cuenta:

- Edad y tamaño del ave
- Volumen de sangre requerido
- Destino posterior del ave ya sea reingreso a la parvada, conservación para obtener muestras posteriormente o sacrificio inmediato.

Técnicas más comunes

Punción de la vena braquial

Para poder observar la vena braquial, es necesario retirar algunas plumas de la superficie ventral de la región del ala. La vena corre a lo largo de la depresión entre los músculos bíceps braquial y tríceps humeral. Una vez localizada, se realiza la punción a nivel de la articulación húmero-radio-cubital. Se recomienda exponer la vena del ala derecha y posteriormente inmovilizar ambas alas con la mano izquierda.^{5, 6, 8}

Extracción de la sangre de la vena safena

Esta vía de sangrado se utiliza en patos y gansos. La vena safena se localiza sobre la aponeurosis de los músculos peroneos, encima del cóndilo lateral del hueso tibiotarsiano. Para exponer la vena se deben retirar las plumas cercanas a la articulación tarsiana.^{5, 8}

Extracción de sangre de la cavidad cardiaca por la entrada del tórax

Aunque puede obtenerse el mayor volúmen de sangre directamente del corazón, hay que tomar en cuenta que este método puede provocar la muerte del ave ya que en caso de realizar una mala punción se puede perforar el pulmón del ave. La extracción por la entrada del tórax puede resultar difícil en pavos, gallos o reproductoras pesadas adultas. Las aves deben colocarse en decúbito dorsal con la quilla hacia arriba. La aguja se introduce en ángulo ventral de la entrada del tórax y se dirige en posición horizontal hacia atrás sobre la línea media hasta

puncionar la pared cardiaca. La aguja a utilizar debe ser de calibre 20 y la longitud de ésta dependerá del tamaño del ave, pudiendo variar desde 3/4 de pulgada hasta dos pulgas.^{5,6}

Sangrado por decapitación

Se aconseja utilizar este método de sangrado para obtener volúmenes suficientes de sangre en pollitos, sobre todo para la determinación de anticuerpos contra alguna enfermedad. Para que la decapitación pueda realizarse en forma súbita y eficiente es conveniente utilizar tijeras bien afiladas.^{4,6}

Punción de la cresta en pollitos

Esta técnica se utiliza para obtener una gota de sangre cuando se necesita hacer un frotis en polluelos recién nacidos. Se punciona con una aguja hipodérmica la parte más sobresaliente de la cresta inmadura.^{5,6}

Punción de la vena yugular en pollitos

Esta técnica se utiliza para obtener un volumen adecuado de sangre, sin tener que sacrificar al pollito, cuando se hace cuidadosamente.

Se toma al pollito con la mano derecha, se le sujeta por alas y patas, dejando la cabeza hacia arriba libre; con la mano izquierda se toma la cabeza del pollo entre los dedos índice y medio, poniendo la palma de la mano opuesta al dorso del ave; esta mano se gira hacia abajo flexionando el cuello del pollo para sujetarlo entre la mano y el resto de los dedos. Así se sujeta al pollo y se expone la vena yugular con una sola mano, quedando libre la derecha para tomar la muestra. La punción de la vena se hace con una aguja de insulina.⁶

Las muestras de sangre obtenidas por cualquiera de las vías deben colectarse lo más asépticamente posible; una vez obtenida la cantidad deseada, se retira la aguja de la jeringa para depositar la sangre en un recipiente y evitar la hemólisis. Dicho recipiente se debe colocar horizontalmente hasta que la sangre se coagule y se separe el suero. Si necesitamos una muestra de sangre sin coagular, es necesario añadir algún anticoagulante al frasco donde se depositará la muestra.⁷

Métodos de eutanasia

Al recibir aves vivas en el área de recepción de casos clínicos, es necesario realizar el sacrificio del ave para poder llevar a cabo la necropsia y toma de muestras.⁸

El término eutanasia se refiere al acto de producir la muerte sin dolor.⁸ Para evaluar la efectividad de una técnica de eutanasia se debe tomar en cuenta lo siguiente:

- Que produzcan una muerte rápida con el mínimo dolor
- Que sea segura para el operario
- Que sea barata
- Que no produzca cambios que interfieran con el diagnóstico

Métodos que más se emplean

- Desnucamiento manual
- Decapitación
- Émbolo gaseoso
- Inyección de sustancias
- Inhalación de sustancias

Desnucamiento manual

Esta técnica consiste en dislocar la articulación occipitocervical. Es una técnica adecuada si se realiza de forma correcta y en aves cuyas características lo permitan. Pollos mayores de 10 semanas, aves reproductoras, gallos y guajolotes dificultan la aplicación correcta de este método.⁸

Para llevar a cabo esta técnica, primero se sujetan los tarsos del ave y la punta de las alas con la mano izquierda, de tal manera que el ave quede en posición vertical. Se toma la cabeza del ave con la mano derecha, se coloca la palma de la mano sobre el cráneo y se rodea el cuello con los dedos índice y pulgar. Después, se dobla la cabeza hacia arriba apoyando los dedos medios y anular bajo el pico. Por último una vez que la cabeza está en esa posición, se realiza un movimiento de tracción con ambas manos, consiguiendo así la desarticulación.⁸

Decapitación

Se recomienda aplicar este método en pollitos recién nacidos o menores de 2 semanas, es muy conveniente cuando se requiere obtener muestras de sangre de los animales que se van a sacrificar. Presenta la ventaja de no afectar el cerebro cuando éste se necesita para realizar estudios histopatológicos.⁸

Esta técnica consiste en cortar enérgica y súbitamente el cuello con unas tijeras para evitar sufrimiento en el animal. Es necesario que las tijeras estén bien ajustadas y tengan buen filo.⁸

Embolo gaseoso

Este método consiste en inyectar por vía endovenosa o intracardiaca de 1 a 5 ml de aire, dependiendo de la edad del ave. Este método presenta varios inconvenientes entre los que se pueden mencionar: causar congestión de vísceras y propicia la contaminación bacteriana en el torrente sanguíneo, lo cual puede interferir en los estudios bacteriológicos. Para reducir esta acción se recomienda utilizar jeringas estériles. Cuando se sangra el ave, este método es muy práctico, pues se pueden combinar ambas operaciones en una, si se tiene cuidado de dejar aire en la jeringa antes de aspirar la sangre.⁹

Inyección de sustancias

Consiste en introducir una dosis letal de anestésico fijo, generalmente por vía endovenosa. La principal desventaja radica en que produce congestión de los órganos.⁹ Entre las sustancias que se pueden utilizar están:

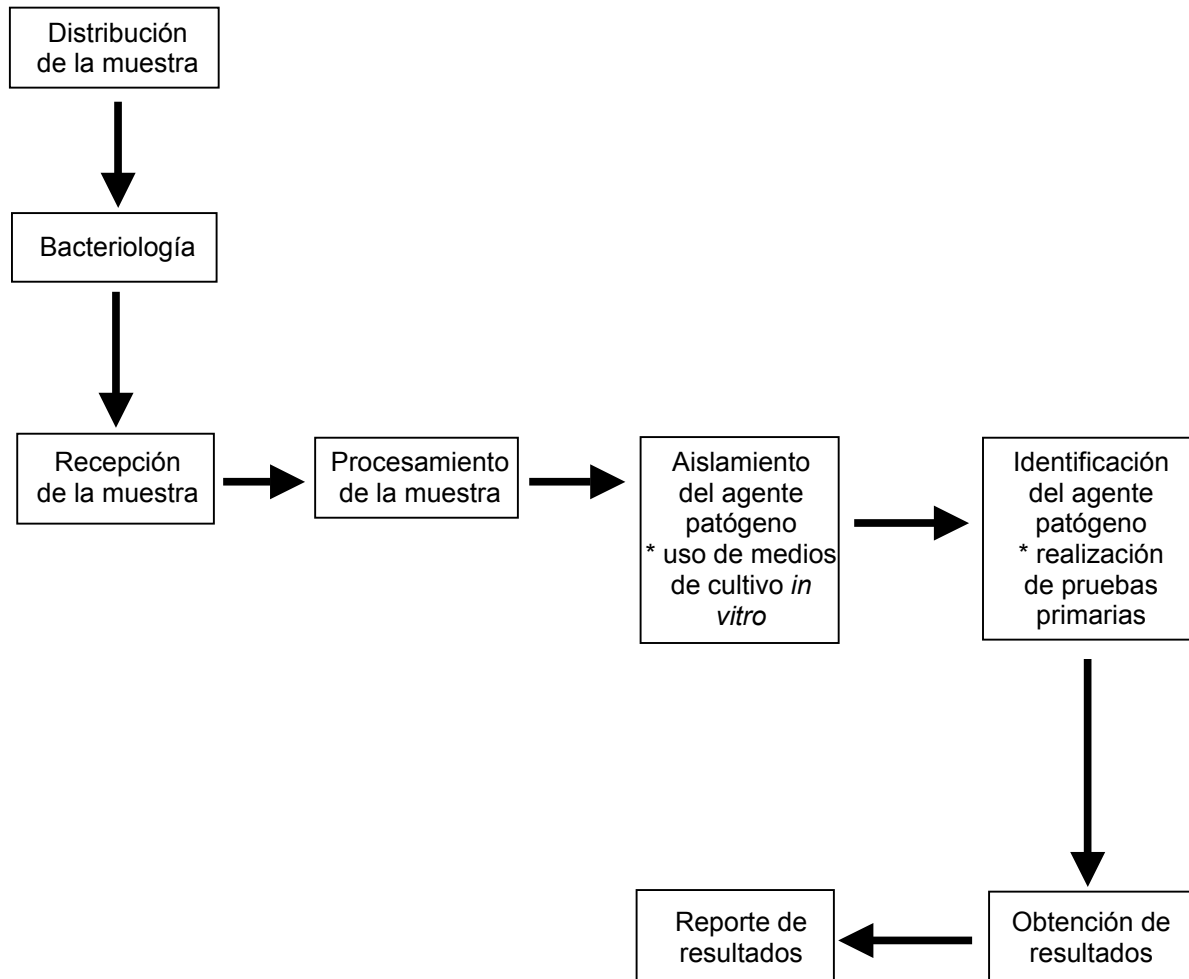
- Pentotal sódico
- Pentobarbital
- Hidrato de cloral
- Sulfato de magnesio

Inhalación de sustancias

Consiste en provocar que el ave aspire o inhale sustancias y gases anestésicos en dosis tóxicas que provoquen su muerte. Las sustancias y gases empleados con este fin son bióxido de carbono, cloroformo y éter. Estos 2 últimos deben usarse con precaución ya que son tóxicos e inflamables.¹¹

La sustancia más recomendable es el bióxido de carbono. Se usa colocando el ave en una cámara o una bolsa de polietileno. Se introduce una manguera, conectada a un tanque de bióxido de carbono para que el ave muera súbitamente. Este método presenta desventajas tales como congestión de los órganos del animal. Además puede ser peligrosa para el prosector pues su inhalación continua daña la salud. ¹¹

FLUJOGRAMA DE BACTERIOLOGÍA



Periodo de estancia

La estancia en esta sección la comencé a partir del 2 de enero y concluí el 2 de febrero del 2007.

La bacteriología es una rama de la medicina utilizada como herramienta para el estudio de las bacterias y sus características. Las muestras utilizadas en el área de bacteriología dependerán de los estudios que se soliciten y del agente que se sospecha; estas muestras pueden ser órganos, hisopos, muestras de heces, vacunas, etc.¹²

Para realizar el estudio de las bacterias es necesario recuperarlas del hábitat natural donde se encuentren y hacer que proliferen en medios artificiales que les

proporcionen sus requerimientos nutricionales. A este procedimiento se le conoce como cultivo *in vitro*.¹²

Tanto las bacterias como los hongos necesitan para su metabolismo de fuentes de energía, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, minerales y factores de crecimiento además de estos nutrientes debemos tomar en cuenta factores fisicoquímicos como: temperatura, pH, humedad y atmósfera de incubación.¹²

ENFERMEDADES BACTERIANAS AVIARES EN CAMPAÑA

- Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar.

La importancia de dicha norma radica en establecer el conjunto de medidas y acciones sanitarias que se realizan para prevenir, detectar, combatir, confinar o erradicar (en su caso) enfermedades o plagas que afectan o puedan afectar a los animales de interés económico en el país, o de áreas geográficas delimitadas, según la enfermedad de que se trate, con el firme objetivo de evitar que causen daños y pérdidas a la ganadería nacional y a los productores pecuarios.¹⁸

Las muestras para cultivos bacteriológicos se deben tomar de aves enfermas, recién sacrificadas o que tengan un máximo de dos horas de haber muerto, debido a la descomposición que pueden sufrir; es necesario refrigerarlas y enviarlas inmediatamente ya que no deben transcurrir más de 12 horas entre su toma y su procesamiento., para evitar que la flora intestinal contamine el organismo o interfiera con el aislamiento del agente causal.¹³

Las muestras se toman en condiciones de asepsia y se colectan en recipientes estériles que se identifican con etiquetas o cintas adheribles. Si se incluyen muestras de diferentes órganos deben enviarse por separado aunque se trate del mismo caso, han de ir acompañados con la historia clínica que debe llevar el mismo número de referencia. Es conveniente señalar los tratamientos de antibióticos (nombre, dosis, duración del tratamiento) ya que la antibioterapia puede interferir con el aislamiento de bacterias.¹³

Material necesario para la toma de muestras:

- Mecheros
- Hisopos estériles

- Medios de cultivos
- Recipientes estériles
- Instrumental estéril: tijeras, pinzas, agujas, jeringas hipodérmicas.

Recomendaciones

Uso del mechero

Es indispensable tener uno o varios mecheros y trabajar a una distancia no mayor de 30cm; para evitar la contaminación de nuestras muestras.¹⁴

Manejo de hisopos

Las muestras de órganos parenquimatosos, exudados y fluidos corporales, pueden tomarse con hisopos estériles para evitar la contaminación de la muestra, se debe tomar el hisopo del lado opuesto del algodón y se corta a la mitad y se introduce en el medio de transporte.¹⁴

Medios de cultivo

En la toma de muestras se pueden utilizar medios líquidos, sólidos o semisólidos, selectivos, diferenciales o de enriquecimiento. Para toma de muestras en el campo, se recomienda utilizar los medios de transporte sólidos con tubo de ensaye con tapón de rosca, debido a que son más difíciles de contaminar y fáciles de transportar. Mientras que en la sala de necropsias se pueden utilizar medios sólidos o líquidos dependiendo de las necesidades del caso.¹⁴

DEMOSTRACIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS A PARTIR DE MUESTRAS CLINICAS.

Un adecuado diagnóstico y tratamiento de las diversas enfermedades producidas por bacterias y hongos generalmente requiere la detección y la identificación del agente etiológico. Esto se logra a través del examen microscópico, aislamiento e identificación del agente y las pruebas de susceptibilidad bacteriana a productos terapéuticos.^{12, 15}

Es conveniente considerar que existen muestras que deben ser trabajadas de inmediato ya que el proceso de refrigeración no puede lograr que se conserven sin presentar alteraciones y multiplicaciones bacterianas aunque sea a ritmo más lento (muestras de orina, semen, agua, heces, leche, etc.)^{12, 15}

DEMOSTRACIÓN

El examen microscópico se realiza de la siguiente manera:

- frotis directo. Este se realiza a partir de una muestra clínica antes de ser sembrada en los medios de cultivo.

La visualización del agente patógeno (bacteria u hongo) o su efecto en el material biológico examinado (tejido, exudados, trasudados, sangre, orina, contenido intestinal, etc.), puede servir para orientar tentativamente a un diagnóstico rápido y poder iniciar un tratamiento. La técnica de tinción a utilizar varía dependiendo del diagnóstico presuntivo.^{12, 13}

Por otro lado cuando hay sospecha de la presencia de microorganismos difíciles de observar (Mycoplasmas) y de teñir por métodos rutinarios (*Micobacterias spp*, *Campylobacter spp*, *Leptospira spp*) el examen microscópico debe incluir métodos de tinción específicos, elaboración de preparaciones húmedas y observación de las mismas en el microscopio de campo oscuro o algún otro procedimiento que permita visualizarlos.^{12, 13}

En el caso de los hongos, el examen microscópico se realiza para observar la presencia de levaduras y filamentos que orienten en la metodología a seguir, así como para la identificación de genero y especie en el caso de hongos pluricelulares.^{12, 13}

AISLAMIENTO

Para lograr la recuperación *in vitro* del agente etiológico (bacteria u hongo) se elegirán medios de cultivo adecuados tomando en consideración el diagnóstico presuntivo, y se sembrarán con la muestra sospechosa. Así mismo, el tiempo de incubación, la temperatura óptima de crecimiento y la atmósfera de incubación (aerobiosis, anaerobiosis o microaerobiosis) se establecerán de acuerdo al agente etiológico del cual se sospeche.^{13, 14}

El crecimiento de una bacteria requiere de un mínimo de 24 horas, pero en algunos casos los tiempos pueden variar de una semana a dos meses. En el caso de los hongos el crecimiento es lento llegando a tardar de 7 – 14 días en promedio.^{13, 14}

Una vez que se logra aislar el agente etiológico *in vitro* se procede a realizar un frotis fijo para poder observar la morfología, agrupación y afinidad tintorial del microorganismo y así poder establecer el tipo de pruebas de identificación que se requieren. A partir de este aislamiento se puede realizar la prueba de susceptibilidad a agentes terapéuticos.^{13, 14}

REQUERIMIENTOS BACTERIANOS

- **Energía.** Los microorganismos obtienen su energía de reacciones metabólicas de óxido – reducción requiriendo de compuestos orgánicos como sustratos oxidables, el más comúnmente utilizado es la glucosa y aceptores de hidrógeno que conducen a la síntesis de ATP. Las bacterias aerobias requieren de O₂ como aceptor de H mientras que las bacterias anaerobias utilizan compuestos orgánicos o inorgánicos como aceptores de H.^{12, 13}
- **Carbono.** Todos los microorganismos requieren de fuentes de carbono para la síntesis de compuestos orgánicos celulares generalmente los mismos compuestos utilizados como fuentes de energía pueden ser utilizados como fuentes de carbono.^{12, 13}
- **Nitrógeno.** El N₂ es un elemento esencial de las proteínas y de otros muchos componentes celulares. El tipo de sustrato que se requiere puede variar de un microorganismo a otro pero en términos generales la mayoría de los microorganismos pueden obtener N₂ a partir de amoníaco (NH₄⁺).^{12, 13}
- **Minerales.** Los microorganismos requieren de minerales para que actúen como cofactores enzimáticos en su gran variedad biomolecular, por ejemplo, el magnesio y el potasio son constituyentes de diversos compuestos orgánicos, el azufre esta presente en grupos sulfhídricos de muchas proteínas, el fósforo se encuentra en los grupos fosfatos de ácidos nucleicos de ATP y de algunas coenzimas. Estos minerales son generalmente incorporados en los medios de cultivo en forma iónica o como sustratos inorgánicos.^{12, 13}
- **Factores de crecimiento.** Son factores que debemos adicionar para favorecer el crecimiento ya que intervienen en pasos metabólicos intermediarios.^{12, 13}

FACTORES FISICOQUÍMICOS

- Temperatura. De acuerdo a sus requerimientos se pueden clasificar en:
 - Psicofilicas: crecen a temperaturas menores a los 10°C
 - Psicofilas: crecen a temperaturas de 10 – 20°C.
 - Mesofilas: crecen a temperaturas de 21 – 40°C
 - Termófilas: crecen a temperaturas mayores a 41°C
- pH. La concentración de iones de hidrógeno que nos da el grado de acidez o alcalinidad de un medio, determinará un adecuado crecimiento.^{12, 13}
- Humedad. La humedad relativa óptima para la mayoría de las bacterias y hongos en cultivos va del 70 – 80%.^{12, 13}
- Atmósfera. De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno las podemos clasificar como:
 - Anaerobios obligados. Crecen en medios bajos de potencial óxido – reducción. El oxígeno es letal para ellos.^{12, 13}
 - Aerobios facultativos. Son capaces de crecer en condiciones de anaerobiosis o aerobiosis.^{12, 13}
 - Aerobios obligados. La presencia de oxígeno es esencial para su crecimiento.^{12, 13}
 - Microaerofilicos. Requieren de una baja presencia de oxígeno y entre 5 – 10% de CO₂.^{12, 13}

MEDIOS DE CULTIVO

La consistencia de los medios esta relacionada directamente con las técnicas de siembra:

- Medios líquidos. Son medios que no contienen agar (agente solidificante) son envasados en tubos, botellas, etc. Se siembran por agitación del asa o bien depositando de forma directa una porción de la muestra. El crecimiento en este tipo de medios se identifica por turbidez. La utilidad de estos medios es aumentar las posibilidades de crecimiento; diluir los efectos tóxicos y observación de motilidad en preparaciones húmedas.^{12, 13}
- Medios semisólidos. Son medios que contienen de 0.5 – 0.75% de agar. Son envasados en tubos. Se resiembran con asa recta por picadura. El

crecimiento se observa por turbidez en el sitio de inoculación en bacterias no móviles y turbidez a los lados del sitio de inoculación en bacterias móviles. Se utilizan con la finalidad de evaluar motilidad bacteriana.^{12, 13}

- Medios sólidos y duros. Los primeros contienen 1.5% de agar y los últimos contienen de 3 – 7%. Pueden envasarse en cajas de Petri o tubos. La utilidad de estos medios radica en el aislamiento de colonias bacterianas o levaduras para la realización de pruebas de susceptibilidad a productos terapéuticos y para guardar cepas bacterianas y micóticas. Los medios duros se utilizan para disminuir el crecimiento invasivo de algunos microorganismos. La técnica de siembra de estos medios cuando se encuentran envasados en cajas de Petri es el aislamiento en cultivo puro. Cuando se siembra en tubo se realiza por estría continua o picadura. Para el cultivo de hongos en cajas o tubos, la siembra se realiza a través de la técnica de punto aislado. Para pruebas de susceptibilidad de productos terapéuticos se usa la siembra por estría cerrada con hisopo.^{12, 13}

CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS: UTILIDAD DIAGNÓSTICA

Los requerimientos nutricionales de las bacterias y hongos son variados por lo cual se cuenta con una amplia gama de estos medios de cultivo.

- Medios de cultivo generales. Promueven el desarrollo de hongos y bacterias poco exigentes ya que contienen los mínimos requerimientos nutricionales. Son usados para análisis cuantitativos, conservación de cepas, muestreos del medio ambiente o superficies. Ejemplos: agar tripticosa soya (TSA), caldo nutritivo, agar dextrosa Sabouraud (DSA).^{5, 17}
- Medios enriquecidos. Son medios que se suplementan con factores de crecimiento para bacterias y hongos de requerimientos nutricionales exigentes. Estos medios contienen uno o más ingredientes que pueden ser: sangre, suero, huevo, carne, vitaminas y aminoácidos específicos. Ejemplo: agar sangre, agar Sabouraud con ácido nicotínico, caldo infusión cerebro – corazón.^{12, 16}
- Medios selectivos. Estos medios contienen sustancias inhibitorias para suprimir total o parcialmente el desarrollo de microorganismos no deseados.

Las sustancias utilizadas con mayor frecuencia son: los colorantes, sales inorgánicas, sales biliares, antibióticos, etc. Los medios selectivos tienen una gran utilidad para el aislamiento de gérmenes patógenos a partir de muestras clínicas que contengan microflora normal. Ejemplo: agar MacConkey, verde brillante, manitol sal agar, etc.^{12, 16}

- Medios diferenciales. Estos medios contienen indicadores 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: agar MacConkey (McC), agar verde brillante (VB), etc.^{12, 16}

- Medios de enriquecimiento. Estos medios son líquidos y poseen efectos inhibitorios sobre ciertos géneros bacterianos, favoreciendo al mismo tiempo a otros que se encuentran en menor proporción en la muestra. Ejemplo: caldo tetracionato, caldo selenito, etc.^{12, 13, 16}

- Medios de transporte. Son utilizados para el transporte de muestras clínicas. Su finalidad es preservar la viabilidad de los microorganismos para su posterior aislamiento. Ejemplo: Medio Frey, Stuart, Solución Salina Fisiológica (SSF)^{12, 13, 16}

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS

El estudio de la morfología de las colonias es de suma importancia debido a que gracias a ésta puede iniciarse una identificación preliminar de los microorganismos aislados.^{12, 13}

Cuando una célula bacteriana o micótica prolifera sobre una superficie sólida da lugar a la formación de un acúmulo de millones de células que pueden observarse a simple vista y reciben el nombre de colonias o clonas.^{12, 13}

Las características morfológicas son constantes para cada especie en idénticas condiciones de cultivo. Para su descripción debemos de tomar en cuenta las siguientes características: tiempo de crecimiento, tamaño, color, borde, superficie, pigmentación, hemólisis y estructura interna.^{12, 13}

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS

Esta es la forma determinante de obtener el diagnóstico. La identificación se basa en la determinación del género y la especie del microorganismo aislado y puede realizarse mediante el uso de pruebas bioquímicas, pruebas biológicas y serológicas.^{12, 13}

El interés de la bacteriología y micología bacteriana se centra alrededor de la identificación de los microorganismos aislados a partir de muestras clínicas, con el fin de poder relacionarlos con grupos previamente clasificados.^{12, 13}

El primer paso en la identificación bacteriana y fungal consiste en la determinación de las características generales de los microorganismos problema. En las bacterias se utilizan criterios de morfología microscópica, agrupación y reacción tintorial. En el caso de los hongos se evalúa el tamaño, la morfología de las estructuras estromáticas y la presencia de esporas sexuales y asexuales.¹⁷

Una vez determinadas estas características se deben consultar tablas o esquemas de identificación, los cuales son variados pero todos conducen de una manera ordenada al conocimiento del género y en lo posible hasta la especie bacteriana y fungal que se desea identificar.¹⁷

Dentro de los diversos sistemas que pueden ser utilizados para la identificación existen los que están basados en pruebas bioquímicas, aunque la tendencia actual es utilizar una serie de complementos tales como: pruebas biológicas, fagotipificación, análisis cromatográfico, serología y otras pruebas inmunológicas.¹⁷

Los métodos bioquímicos utilizan pruebas donde se ponen de manifiesto reacciones metabólicas sobre sustratos conocidos. Las pruebas biológicas se fundamentan en el daño que pueden ocasionar los microorganismos en un hospedador susceptible, siendo los mas utilizados los animales de laboratorio. Para la realización de este tipo de pruebas es necesario que el organismo haya sido parcialmente identificado a nivel de género mediante pruebas bioquímicas.^{12,}

¹⁷

La fagotipificación se emplea debido a la especificidad que muestran los bacteriófagos por ciertas especies o cepas bacterianas. Este método de

identificación se usa principalmente con *Brucella abortus*, *Bacillus anthracis* y *Staphilococos spp.*^{12, 17}

El análisis cromatográfico consiste en la determinación de los ácidos grasos volátiles formados como productos metabólicos de los medios de cultivo y es particularmente útil en la diferenciación de microorganismos del género *Clostridium*.^{12, 17}

Para la identificación fungal la morfología estructural sigue siendo el método mas utilizado y ésto sólo se puede efectuar a través de la observación repetida de las estructuras reconocidas como diferenciales entre géneros y especies. La pigmentación que presentan las colonias de hongos es un elemento de diferenciación primaria por lo cual es indispensable utilizar medios de cultivo convencionales.^{12, 17}

PRUEBAS PRIMARIAS

- Métodos de Tinción. Tienen la ventaja de proporcionar contraste entre el organismo y el medio que lo rodea, permitiendo llevar a cabo una diferenciación a través de su morfología, nos permite el estudio de estructuras propias de la célula bacteriana y micótica.^{12, 13}
 - Tinción de Gram. es aplicada en forma general como primer paso de la identificación de bacterias y levaduras. Este método divide a las bacterias en 2 grupos Gram(+) y Gram(-) de acuerdo a los componentes predominantes de su pared celular y permite así mismo la observación microscópica de su morfología (cocos, bacilos), el tamaño y agrupación que suelen presentar (cadenas, racimos). Primer paso, realizar una impronta de la colonia en un frotis, posteriormente se coloca violeta de genciana y al añadir una solución débil de yodo se combinan estos con algunos componentes de la célula bacteriana y son retenidos por la pared celular. Al agregar el alcohol – acetona la pared de las bacterias Gram(+) sufre una deshidratación que impide la salida del colorante. En el caso de las Gram(-) el decolorante destruye la integridad de la membrana externa, aumentando su permeabilidad lo que permite la salida del colorante primario. En consecuencia la fucsina

básica es incapaz de entrar en la pared del primer grupo mientras que se incorpora en la pared del segundo. Gram(+) se observan de color azul o morado y Gram(-) se observan rosas.^{12, 13}

◦ Tinción de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). Al igual que la tinción anterior se usan 2 colorantes, el primario fucsina fenicada entra en la bacteria debido a que se encuentra disuelto en fenol y se aplica en presencia de calor. Al aplicar el alcohol – acetona no se solubilizan los lípidos de los BAAR y no se decoloran mientras que en los que no son BAAR son decolorados fácilmente por lo que al aplicar el segundo colorante azul de metileno se tiñen de este color.^{12, 13}

◦ Tinción verde de malaquita. Se aplica calor para forzar la entrada del verde de malaquita y una vez que ha penetrado se enjuaga y se agrega el segundo colorante, fucsina. En caso de existir esporas estas se tiñen de color verde.^{12, 13}

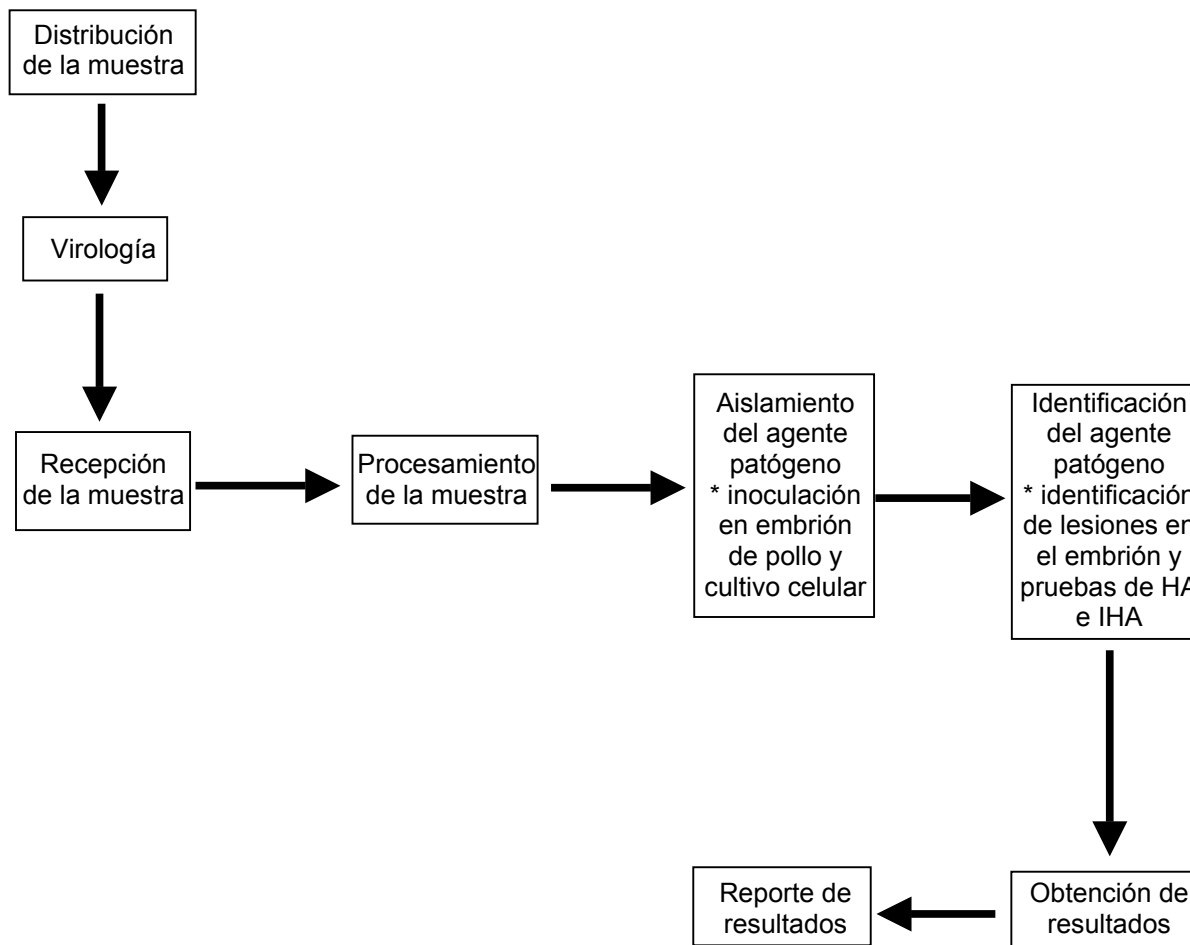
Pruebas primarias después de la identificación por Tinción de Gram.

Demostración	Pruebas primarias	Género	Pruebas complementarias
Cocos Gram(+)	Catalasa	<i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcus</i> <i>Streptococcus</i>	Cuagulasa, O/F, urea, pigmento. Uso de CHO'S
Bacilos Gram(+)	Esporas	<i>Bacillus</i> (aerobio) <i>Clostridium</i> (anaerobio) <i>Listeria</i> <i>Erysipelothrix</i> <i>Corynebacteriu</i> <i>m</i>	Motilidad, hemolisis, pruebas biológicas Análisis cromatográfico Catalasa, hemolisis, H ₂ S, uso de CHO'S
Bacilos Gram(-)	Oxidasa	<i>Brucilla</i>	TSI, SIM, urea, citrato,

		<i>Bordetella</i> <i>Pasteurella</i>	reducción de nitratos, H ₂ S, uso de CHO'S.
		<i>Enterobactrias</i> <i>Haemophilus</i> <i>Fusobacterium</i>	TSI, SIM, urea, citrato, uso de CHO'S, requerimiento de NAD.
Filamentos Gram(+)	Crecimiento en anaerobiosis	<i>Actynomyces</i> <i>Nocardia</i>	Crecimiento en microaerobiosis, catalasa. Hidrólisis de caseína, tirosina.
BAAR	Morfología de las colonias, producción de pigmento	<i>Mycobacterium</i>	Síntesis de niacina, producción de pirazinamidasas
Formas "L" pleomorfas	Síntesis de pared celular en ausencia de antibióticos	<i>Formas L bacterianas</i> <i>Mycoplasma</i> <i>Ureaplasma</i> <i>Acholeplasma</i>	Morfología y pbas. Bioquímicas Urea, inhibición de crecimiento y metabolismo usando antiseros específicos

- Motilidad. La observación de microorganismos con o sin motilidad usando preparaciones húmedas nos permiten evaluar distintos tipos de movimiento como son: movimiento browniano, de corrientes, movimiento flagelar.^{12, 13}

FLUJOGRAMA DE VIROLOGÍA



Periodo de estancia

Mi estancia en esta sección la comencé a partir del 13 de noviembre y concluyó el 29 de diciembre del 2006.

La virología es una rama de la medicina utilizada como herramienta para el estudio de los virus y sus propiedades. Las muestras utilizadas en el área se citan en el cuadro adjunto titulado Toma y envío de muestras (Cuadro 1).¹⁹

AISAMIENTO VIRAL

La base del diagnóstico viral es la detección del virus o de sus componentes. El aislamiento del virus es la técnica de oro sobre la cual se miden las otras pruebas

de diagnóstico viral. De igual forma el aislamiento de virus tiene una sensibilidad y una especificidad muy alta. Debido a que sólo se amplifica el virus, se aumenta la sensibilidad sin disminuir la especificidad. Sin embargo, existen algunas desventajas en el aislamiento del virus: el proceso suele ser lento, ya que demanda días a semanas para la identificación, y en consecuencia puede no estar disponible a tiempo para el cliente.²⁰

ENFERMEDADES VIRALES AVIARES EN CAMPAÑA

- Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Newcastle, presentación velogénica.²⁷
- Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-199, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.²⁸

MUESTRAS IDEALES POR ENFERMEDAD DE ACUERDO A LAS NORMAS OFICIALES MEXICANAS QUE LAS RIGEN.

- **Enfermedad de Newcastle.**
 - Tráquea
 - Pulmón
 - Bazo
 - Encéfalo
 - Tonsilas cecales
- **Influenza aviar.**
 - Para la realización de la prueba de aislamiento viral las muestras deben corresponder a aves vivas y/o a muestras de órganos (tráquea, pulmón, bazo y tonsilas cecales) y/o hisopos traqueales y/o hisopos cloacales y/o heces y/o gallinaza y/o pollinaza y/o cualquier otro tipo de muestra determinado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) , según corresponda por función zootécnica, tipo de constatación y vigilancia epidemiológica.^{27, 28}
- **Bronquitis infecciosa**^{19, 25}
 - Tráquea
 - Pulmón
 - Riñón

- Oviducto
- Tonsilas cecales
- Hisopos traqueales
- **Laringotraqueitis infecciosa** ^{19, 25}
 - Tráquea-laringe
 - Tejido pulmonar
 - Membrana corioalantoidea
- **Viruela aviar 19, 25**
 - Viruela seca: muestras de piel con signos de la lesión (pústulas, costras, etc.)
 - Viruela húmeda: tráquea, laringe, lengua y pulmón.
 - Membrana corioalantoidea
- **Infección de la bolsa de Fabricio** ^{19, 25}
 - Bolsa de Fabricio
- **Hepatitis por cuerpos de inclusión** ^{19, 25}
 - Hígado
 - Riñón
 - Bazo
 - Intestino

VIAS DE INOCULACIÓN

- **Cavidad alantoidea.** La inoculación se realiza 3 mm por encima de la cámara de aire. Se introduce toda la aguja de una jeringa de insulina en un ángulo de 90°. ²⁰
- **Saco vitelino.** La inoculación se hace a través de una perforación realizada en la parte central de la cámara de aire. Se utiliza una jeringa de 3 ml y se introduce toda la aguja en un ángulo de 90°. ²⁰
- **Cámara falsa.** Se realiza en un área oscura con ayuda del ovoscopio. Se realiza una perforación en la parte central de la cámara de aire con una aguja gruesa desinfectada con alcohol al 70%. Se realiza una segunda perforación en la parte central del embrión del lado opuesto al que este se encuentra. Con ayuda de una perilla previamente desinfectada; se coloca sobre la perforación

ubicada en la cámara de aire y de forma delicada se saca el aire provocando una presión negativa que permita el desprendimiento de la membrana corioalantoidea y la formación de una falsa cámara de aire en el segundo punto de inoculación en el cual se va a introducir el bisel de la aguja en un ángulo de 45°. ²⁰

PROCEDIMIENTOS GENERALES

- **Equipo de trabajo**
 - Micropipeta única o multicanal
 - Centrífuga
 - Ovoscopio
 - Campana de flujo laminar
 - Placas (fondo en V y fondo plano)
 - Reactivos, desinfectantes y medios
 - Tijeras, pinzas, embriones de pollos, etc.
- **Recepción de muestras.** La primera parte de estos procedimientos es la recepción de muestras; las muestras son colocadas en un refrigerador a una temperatura de 4°C para su conservación.
- **Reconocimiento de la muestra.** Se evalúa que las muestras sean las adecuadas para el tipo de estudio que se va a realizar, que se encuentren identificadas, se verifica su estado, la cantidad y la calidad de estas.
- **Preparación del inóculo.** Se realiza un macerado de los tejidos, se pesan previamente 10 g de cada muestra de órganos por caso; agregando solución buferada de fosfatos (PBS), manteniendo una concentración de 1:10. El macerado se vierte en tubo de centrifuga hasta llegar a los 25 ml. En el caso de muestras de hisopos se colocan de 15 – 16 hisopos en cada tubo y se coloca PBS en proporción de 2 ml por cada hisopo; las muestras de heces se colocan directamente en los tubos de centrifuga (5 g de heces por tubo) y se colocan 30 ml de PBS. El macerado es centrifugado a 2500 revoluciones por minuto (rpm) por 10 minutos. En el caso de muestras de hisopos se colocan de 15 – 16 hisopos en cada tubo y se coloca PBS en proporción de 2 ml por cada hisopo; las muestras de heces se colocan directamente en los tubos de

centrífuga y se colocan 30 ml de PBS. El macerado es centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. Filtrado con un filtro de membrana de 0.45µm, obteniendo de esta manera el inóculo. Se coloca antibiótico (penicilina – estreptomycin) y se deja reposar por 15 minutos. La inoculación se realiza en embriones de pollo de 9 a 11 días de edad libres de anticuerpos específicos contra el virus (ALPES), utilizando la cavidad alantoidea, cámara falsa o saco vitelino como ruta de inoculación.^{27, 28}

- **Ovoscopiado.** Tiene como finalidad observar la viabilidad del embrión. Se realiza en un cuarto oscuro con un ovoscopio que es un instrumento que proyecta una luz incandescente que al colocarse sobre el huevo embrionado favorece la visibilidad de sus estructuras. El ovoscopio se coloca en el polo obtuso del embrión, donde se encuentra la cámara de aire, así se puede identificar el punto de inoculación, además de verificar su viabilidad la cual se observa a través de una irrigación marcada, y movimientos y tamaño del embrión.²⁶

- **Inoculación.** Inicia determinando el número de embriones que se van a utilizar, esto dependerá de la enfermedad de la que se trate. Una vez que se tienen los embriones exactos que se van a utilizar se colocan en la campana de flujo laminar, se identifican los embriones con respecto a la muestra que se inoculará. Se asperjan con alcohol al 70% posteriormente se coloca yodo al 4% en los puntos de inoculación y se desinfecta la punta del taladro utilizando yodo. Se realiza la perforación en el punto indicado (3 mm por encima de la cámara de aire) se toma con una jeringa de 1ml el inóculo y se deposita en el embrión. Por último se sella el punto de inoculación utilizando una gota de resistol y se colocan los embriones en la incubadora.^{20, 24}

- **Revisión del embrión.** Generalmente los huevos embrionados se dejan incubar por 6 días, realizando una revisión diaria para observar la mortalidad, dependiendo de la enfermedad de la que se sospeche se pueden realizar pases ciegos (BI – IBF). Los embriones que mueran en las primeras 24 horas son descartados, ya que se considera muerte por traumatismo o por contaminación.^{20, 26}

- **Realización de pruebas complementarias para los aislamientos virales**
 - **Hemoaglutinación (HA).** Es una prueba que puede detectar cualquier virus hemoaglutinante, con ayuda de glóbulos rojos de pollo al 2%, ya que la hemoaglutinina se une a los receptores de membrana del glóbulo rojo. Se colocan 100 µl de líquido alantoideo con ayuda de una micropipeta sobre una placa de polietileno y se coloca posteriormente la misma cantidad de glóbulos rojos al 2%; se homogeniza la muestra dando movimientos circulares a la placa. Se incuba por 7 minutos, a los 3.5 minutos se realiza una primera lectura. La interpretación positiva de esta prueba se observa con la formación de grumos lo cual indica la presencia de un virus que esta aglutinando a los glóbulos rojos.^{20, 27, 28}
 - **Inhibición de la hemoaglutinación método alfa (H1α).** Esta prueba se realiza a todas las muestras que dieron un resultado positivo en la HA. La presencia de un virus hemoaglutinante reaccionara con el anticuerpo (Ac), ocasionando una reacción antígeno – anticuerpo (Ag – Ac) y al agregar los glóbulos rojos a una concentración del 0.5% no habrá receptores libres para unirse al glóbulo rojo, lo que trae como consecuencia la sedimentación y formación de un botón en el fondo de la placa que al inclinar en un ángulo de 45° forman una lágrima.^{20, 27, 28}

Revisión de las lesiones en embrión de pollo

Bronquitis infecciosa^{19, 23, 25}

- Membrana amniótica: engrosada, fibrosa y edematosa.
- Enanismo y enroscamiento
- Hemorragias cutáneas
- Deformación del dedo medio
- Uratos en mesonefros

Laringotraqueítis infecciosa^{19, 23, 25}

- Lesiones en la membrana coriolantoidea (MCA) como pueden ser pústulas, edema y engrosamiento alrededor del punto de inoculación.

- Estudio histopatológico de la membrana: presencia de cuerpos de inclusión intranucleares

Viruela aviar^{19, 23, 25}

- Lesiones en la MCA como pueden ser pústulas, edema y engrosamiento alrededor del punto de inoculación.
- Estudio histopatológico de la membrana: presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos

Infección de la bolsa de Fabricio^{19, 23, 25}

- Lesiones en la MCA como pueden ser edema y engrosamiento alrededor del punto de inoculación.
- Enanismo del embrión, congestión y hemorragias en el embrión.
- Puntos necróticos en el hígado y en ocasiones coloración verdosa.

Hepatitis por cuerpos de inclusión^{19, 23, 25}

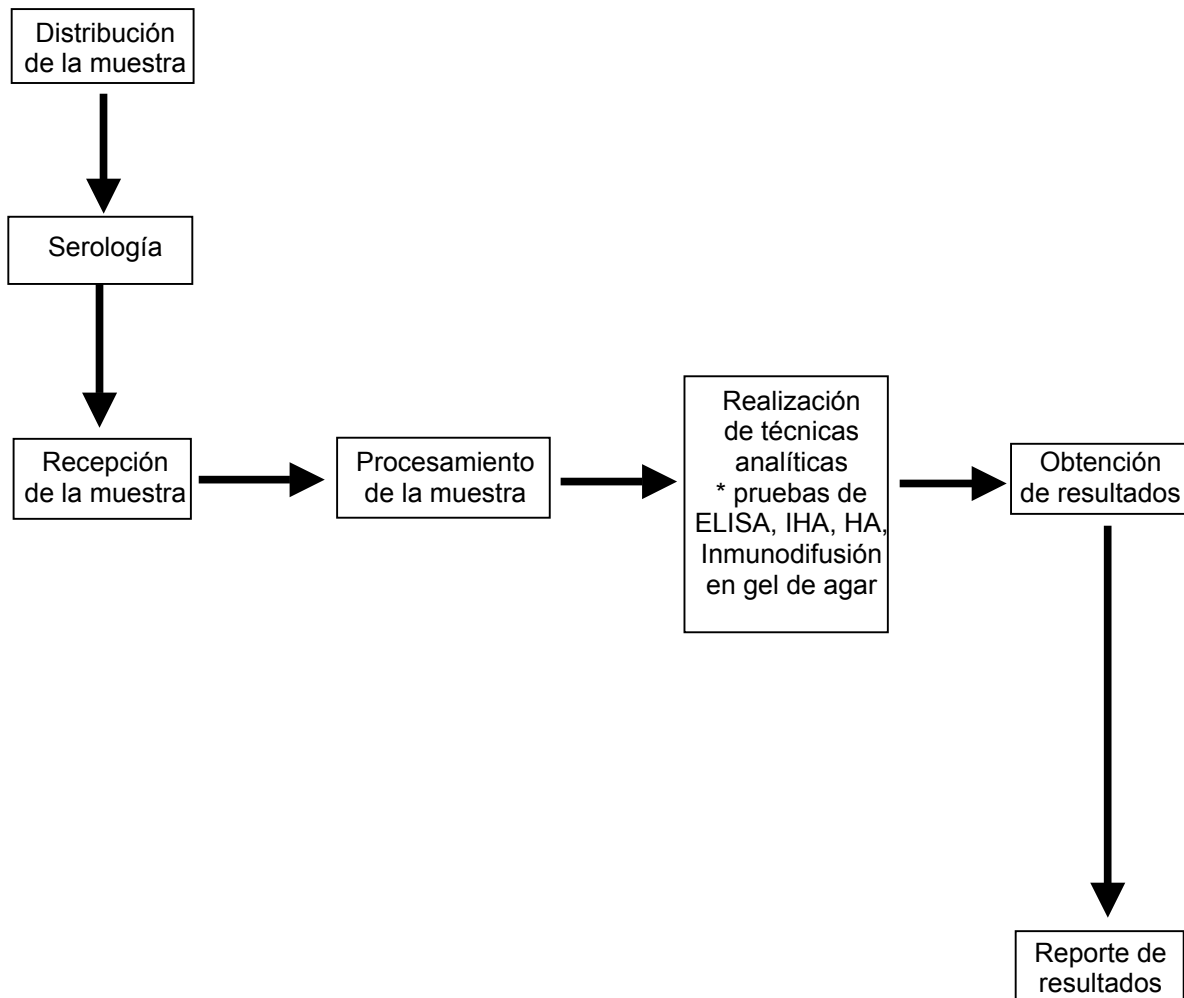
- Mortalidad embrionaria entre el 4º y 5º día post-inoculación.
- Embriones con hemorragias generalizadas
- Lóbulos hepáticos con hemorragias equimóticas.
- Esplenomegalia
- Estudio histopatológico de los lóbulos hepáticos: presencia de cuerpos de inclusión intranucleares.
- **Titulación de vacunas.**
 - ***Vacunas de ENC – BI.*** Primero se debe activar la vacuna con PBS estéril y se coloca antibiótico; después se realizan diluciones décuples, se inoculan en embriones de pollo se incuban. Posteriormente se realiza la HA para conocer a partir de qué dilución hay presencia de virus para que hemoaglutine a los glóbulos rojos al 2% y se realiza la titulación por el método de Reed and Muench.
 - ***Vacunas de IBF.*** Se utiliza un cultivo de células de fibroblastos de embrión de pollo para evaluar la vacuna. El cultivo celular se realiza a partir de embriones de pollo, se extraen las vísceras, la cabeza y las patas, se lava en PBS y se pasa a un vaso de precipitado combinado con antibiótico y tripsina, se corta el embrión lo más fino que se pueda.

Se agita en una platina y se deja reposar, posteriormente se decanta la solución y se le agrega un poco más de la solución anterior para volver agitar. Se filtra con un embudo cubierto con una malla, el decantado se recibe en un matraz que contiene suero de ternera. Una vez que se terminó de decantar se agrega MEM, bicarbonato y antibiótico; se coloca en dos tubos de centrifuga y se centrifugan por 10 minutos a 2500 rpm. Posteriormente se desprende el botón de células, se miden y se colocan en MEM con suero de ternera, antibiótico y bicarbonato. En las placas utilizadas para la dilución de la vacuna se colocan en todos los pozos a excepción de los controles, en la primera fila se coloca la vacuna y se hacen diluciones dobles seriadas de la fila A – H. Para la titulación se transfiere de la placa de dilución a las placas de titulación en la misma secuencia y orden de filas se agrega el MEM mezclado con antibiótico, bicarbonato, suero y las células iniciando por los controles. Se colocan las placas en la estufa de CO₂ y se incuban por 4 días. Posteriormente se observan en el microscopio la placa para observar el efecto citopático del virus sobre las células. ^{21, 22}

- **Preparación de soluciones y medios de trabajo**
 - ***PBS***
 - ***Alcohol al 70%..***
 - ***Medio esencial modificado (MEM).***

- **Preparación de cultivo celular para la titulación de vacunas.**

FLUJOGRAMA DE SEROLOGÍA



Periodo de estancia

Mi estancia en esta sección inició el 9 de octubre y concluyó el 10 de noviembre del 2006.

La serología es una rama de la medicina utilizada como herramienta para detectar la presencia de anticuerpos contra un agente determinado, utilizando el líquido seroso de la sangre.²⁰

ESTUDIOS SEROLÓGICOS

Se llevan a cabo para la determinación de anticuerpos, esto nos permite evaluar el estado inmune de las aves. Las muestras deben ser colectadas de preferencia siempre de animales con la misma edad y bajo las mismas condiciones. La edad

es un factor sencillo de comprender, pero puede haber cambios de los títulos de anticuerpos cuando otros factores están presentes. Por eso, es importante que al momento de la toma de muestras se tome nota de las condiciones del lote y del ambiente.^{24, 33}

La sangre debe ser vertida al frasco con mucho cuidado para que no ocurra hemólisis. El suero debe ser colectado con cuidado en frascos secos para que no exista dilución del mismo. Para prevenir la concentración del suero el sellado de los frascos debe ser bueno ya que la muestra puede deshidratarse por evaporación durante el almacenaje.^{24, 33}

RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune está representada por la inmunidad humoral, mediada por anticuerpos y por la inmunidad celular, dada por la actividad de los linfocitos T. Por lo tanto hay técnicas encaminadas a cuantificar la inmunidad humoral y la celular.³¹

Las pruebas serológicas detectan anticuerpos específicos contra algún agente en el suero; estas pruebas sirven para evaluar el estado inmunológico de la parvada en el caso de que haya sido vacunada. Una elevación de los anticuerpos contra determinado agente en aves sin vacunar, o la presencia de niveles superiores a los obtenidos por la vacunación puede ser indicio de una infección.³¹

PRUEBAS SEROLÓGICAS

Las pruebas serológicas pueden clasificarse en dos categorías:

- *Pruebas de fijación primaria.* Miden directamente el antígeno por el anticuerpo; se realizan al combinar antígenos y anticuerpos, y luego se miden las cantidades de complejos inmunes formados. Como ejemplo están las pruebas de inmunofluorescencia y ELISA. Las técnicas de inmunofluorescencia detectan y cuantifican los complejos inmunes en los tejidos mediante el uso de una sustancia fluorescente. Los métodos de inmunofluorescencia más utilizados son el método directo e indirecto.^{29, 33}

La técnica de Elisa es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa (enzyme linked inmuno sorbent assay). Como todo ensayo inmunoenzimático, la

prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos ó anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario a nivel de distintos fluidos biológicos.³³

De un modo general se procede a la fijación de uno de los componentes de la reacción inmunológica (antígeno Ag o anticuerpo Ac) a un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario. El complejo inmunológico formado es enfrentado luego a las moléculas capaces de reconocer a su componente más superficial, marcadas con una enzima; agregándose posteriormente un sustrato y cromógeno de la enzima marcadora. La existencia de una reacción inmunológica se demuestra y se cuantifica midiendo espectrofotométricamente la cantidad de producto enzimático resultante.³³

Los principales métodos de ELISA utilizados son:

Método indirecto: También conocido como método Sándwich (Anticuerpo-antígeno-anticuerpo), se basa en la fijación de un anticuerpo a la fase sólida, el cual atrapa los antígenos homólogos en las muestras que posteriormente son identificados con un anticuerpo específico marcado con una enzima. En estos casos la cantidad de antígeno es directamente proporcional a la cantidad de producto enzimático formado.³³

[<	[<o	[<o> - Peroxidasa	[Generación de color
Pozos Recubiertos	Muestra	Conjugado	Sustrato-cromógeno

Método competitivo: Se basa en la competencia que se establece entre un antígeno marcado enzimáticamente y el mismo antígeno sin marcar (muestra objetivo) al ser colocados frente a una cantidad limitada del anticuerpo homólogo fijado a la fase sólida. En estos casos la cantidad de antígeno es indirectamente proporcional a la cantidad de producto enzimático formado.³³

[<	[< o o -Peroxidasa	[Generación de color
Pozos Recubiertos	Muestra -Conjugado	Sustrato-cromógeno

- *Pruebas de unión secundaria.* Consisten en dos etapas, en la primera se lleva a cabo la formación del complejo inmune. La segunda etapa queda determinada por el estado físico del antígeno; si los anticuerpos recombinan con antígenos solubles forman complejos inmunes que precipitan en condiciones adecuadas. Si los antígenos son particulados por ejemplo bacterias o células entonces se produce aglutinación.³³

La reacción antígeno – anticuerpo puede desencadenar la activación del sistema del complemento, que también puede medirse.

Entre las pruebas de precipitación más utilizadas, se encuentra la Doble Inmunodifusión en Gel de Agar (DIGA), que se basa en que los complejos inmunes precipitan en una placa de agar formando líneas de identidad. Esta técnica se realiza para el diagnóstico y serotipificación de reovirus, HCl, encefalomiелitis e infección de la bolsa de Fabricio.³³

En las pruebas de aglutinación los anticuerpos establecen uniones cruzadas con los antígenos, lo que permite que se agrupen o aglutinen los complejos inmunes. Se utiliza para el diagnóstico de *Salmonella sp*, *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*.³³

La inhibición de la hemoaglutinación consiste en la inhibición de la capacidad hemoaglutinante de algunos virus y algunos micoplasmas, por anticuerpos específicos. La técnica beta es la más utilizada, requiere de una cantidad constante de virus y diluciones de suero. En la técnica alfa se utiliza una cantidad constante de suero y diluciones de virus; en ambas técnicas se utilizan glóbulos rojos de pollo como marcadores. A través de esta prueba se puede realizar el diagnóstico para la enfermedad de Newcastle, influenza aviar, bronquitis infecciosa (después de haber sido tratado enzimáticamente con fosfolipasa) y el adenovirus del síndrome de baja de postura y algunas especies de *Mycoplasmas*.³³

Las pruebas de neutralización estiman las capacidades de los anticuerpos para neutralizar *in vitro* la actividad biológica del agente sobre un sistema huésped que pueden ser embriones de pollo o cultivos celulares. Los procedimientos utilizados pueden ser alfa o beta. En el diagnóstico aviar, se aplican principalmente para el

diagnóstico y serotipificación de bronquitis infecciosa, infección de la bolsa de Fabricio, reovirus, entre otras.³⁰

MICOTOXINAS

Los metabolitos tóxicos de los hongos generalmente se encuentran como contaminantes en los granos, los problemas por micotoxicosis más importantes se refieren a las aflatoxinas, ochratoxinas, tricotecenos, zearalenona y vomitoxina. Por lo anterior la muestra de elección para el diagnóstico de estos problemas es el alimento de las aves o sus ingredientes.³²

Un diagnóstico presuntivo para las aflatoxinas, se realiza detectando la presencia del ácido kójico en el grano o alimento (metabolito producido por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*) mediante el uso de una lámpara de luz ultravioleta. La presencia de una fluorescencia amarillo verdosa indica el crecimiento del hongo.³²

El diagnóstico definitivo incluye la identificación y cuantificación de las toxinas específicas mediante cromatografía de capa delgada, cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de gases de alta presión, ELISA con anticuerpos monoclonales y finalmente espectrofotometría de absorción atómica.³³

ENTREGA DE RESULTADOS

Una vez que se han concluido las pruebas correspondientes se procede a la captura de resultados, estos se van a dividir en resultados de casos de campaña o casos clínicos. Los resultados de campaña además de ser firmados por un médico certificado deberán ser reportados a SAGARPA; mientras que los resultados de casos clínicos son firmados por el médico responsable del área para su posterior reporte a los clientes.

CASO CLÍNICO

Para complementar el informe de trabajo profesional se realizará la descripción de un caso clínico de interés el cual será referido a continuación.

Fueron remitidos al laboratorio de diagnóstico 2 pollos de engorda de la estirpe comercial Ross x Ross de 7.5 semanas de edad, procedentes de Queretaro. Las dos aves provenían de una parvada de 77,000 aves con un ciclo de producción todo dentro – todo fuera. El alimento que recibían estas aves era comercial. Su calendario de vacunación aplicado es el indicado en el cuadro 1.

CUADRO 1

<i>Enfermedad</i>	<i>Edad (días)</i>	<i>Cepa</i>
Marek	1	HVT, SB1
IBF	1	Intermedia
LT	1	Recombinante
Coccidias	1	Coccibac
ENC	2	-
BI	5	-
ENC + BI	7	-
ENC + IA	7	Emulsionada
IBF	9	-
IBF	19	-
ENC + IA	24	Emulsionada
LT	24	-

- IBF. Infección de la bolsa de Fabricio
- LT. Laringotraqueitis
- ENC. Enfermedad de Newcastle
- BI. Bronquitis Infecciosa
- IA. Influenza Aviar

Historia clínica

Cerca de un 10% de la parvada se encontraba afectada, la mortalidad de las aves afectadas fue del 1%. Los parámetros referentes al consumo de agua y alimento disminuyeron en el caso de las aves enfermas. La cama se encontraba húmeda.

Por otro lado los signos que presentaban las aves eran:

- lesiones nodulares en cresta
- lesiones nodulares en barbilla
- estertores
- boqueo y lagrimeo

Ante estos signos y lesiones externas, se decidió realizar la eutanasia de las aves para posteriormente realizar la necropsia y la toma de muestras correspondiente.

Hallazgos a la necropsia

Las áreas de la cresta y la barbilla presentaban formación de costras y algunas zonas con una ligera descamación (Figura 1 y 2). A nivel de laringe – traquea se observaron pequeños nódulos de color blanco opaco (Figura 3). Mientras que en el resto de los órganos no se observaron cambios patológicos aparentes. Se tomaron muestras para aislamiento viral de viruela aviar y muestras para estudios histopatológicos de los órganos afectados: piel y tráquea - laringe.

Resultados

Estudio histológico.

- Piel. Se observó proliferación multinodular de células pleomórficas que corresponden a linfocitos en el tejido subcutáneo. También se encontraron múltiples hemorragias, así como áreas de edema y exudado inflamatorio con macrófagos. Presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos.
- Tráquea. Hiperplasia de la mucosa de la tráquea con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos (figura 4).

Aislamiento viral

Las muestras fueron inoculadas en embrión de pollo de 9 días de edad por vía corioalantoidea, después de 7 días posinoculación y revisar los embriones, se observaron lesiones postulares proliferativas locales en el sitio de inoculación

(Figuras 5 y 6). Las membranas con presencia de lesiones fueron sometidas a estudios histológicos.

Los resultados del aislamiento viral y los estudios histopatológicos confirmaron la presencia de viruela aviar en su presentación seca y húmeda.

Características de la enfermedad de Viruela Aviar (VA).

Introducción

Es una enfermedad viral común de las aves domésticas de difusión lenta, caracterizada por producir lesiones cutáneas nodulares y proliferativas en zonas de apterilos (viruela seca) y lesiones proliferativas en membranas mucosas como las del tracto respiratorio superior, boca y esófago (viruela húmeda).²⁵

Etiología.

Los *poxvirus* aviares son miembros del genero *Avipoxvirus*, de la familia *Poxviridae*. Son virus DNA con forma de ladrillo y mide cerca de 250 x 354 nm.²⁵

³⁴

Importancia

Su distribución es mundial. Su importancia radica en que causa retraso del crecimiento, pérdidas económicas debido a decomisos, predisposición a otras enfermedades debido a que causa inmunodepresión.²⁵

Transmisión

La transmisión puede darse de forma mecánica o por lesiones de continuidad en la piel. Los insectos actúan como vectores mecánicos que pueden depositar el virus en el ojo; el virus puede alcanzar la región laríngea vía ducto lagrimal causando infección en el tracto respiratorio superior.²⁵

Periodo de incubación

Tiene un periodo de incubación de 4 – 10 días, con una morbilidad que puede ir del 10 al 100%; la mortalidad es baja en casos de viruela seca, aumenta cuando hay problemas de viruela húmeda debido a que las aves muestran inanición y pueden morir por asfixia al desprenderse las lesiones diftéricas en el tracto respiratorio.^{34, 35} En casos severos puede llegar hasta el 50% la mortalidad, esto se presenta cuando se complica con otras enfermedades, resultado de un estado de inmunodepresión.²⁵

Presentación

La presentación de esta enfermedad puede ser:

- seca o cutánea: es la más frecuente afecta la cresta, barbillas, comisuras del pico y zonas de apterilos.²⁵
- húmeda o diftérica: se presenta en mucosa respiratoria y digestiva superior. La entrada del virus puede ser por inhalación o ingestión.²⁵

Signos

Los signos que presentan las aves afectadas son:

- viruela seca: lesiones nodulares en la cresta, barbilla, párpados y zona de apterilos^{25, 35}
- viruela húmeda: signos respiratorios como pueden ser estornudos, boqueo, adherencia palpebral, lagrimeo, etc.^{25, 35}

Lesiones macroscópicas y microscópicas

Las lesiones macroscópicas que se pueden observar dependiendo de la presentación de la enfermedad son:

- viruela seca: hiperplasia epitelial local involucrando epidermis y folículos de la pluma con formación de nódulos que primero parecen pequeños focos blancos hasta aumentar rápidamente de tamaño y llegan a ser amarillos. Las primeras lesiones se observan al 4º día, la formación de pápulas se presentan al 5º – 6º día y la formación de la costra sucede entre 1 – 2 semanas, finalizando con la descamación del epitelio degenerando en forma de costra.^{25, 34, 35}
- viruela húmeda: se observan nódulos ligeramente elevados de color blanco, los cuales aumentan rápidamente de tamaño, llegan a ser amarillentos, necróticos formando membranas diftéricas que al ser removidas sangran. El proceso inflamatorio se puede extender a senos principalmente infraorbitarios, también a faringe, laringe y esófago.^{25, 34,}

35

Las lesiones microscópicas que caracterizan a esta enfermedad es la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos tipo A, llamados cuerpos de Bolliger.

Estos cuerpos de inclusión pueden estar presentes en varios estados de desarrollo dependiendo del tiempo de infección.²⁵

Diagnóstico Diferencial

El diagnóstico diferencial se realiza con:

- enfermedad de Marek: esta no presenta costras y produce inflamación en el folículo de la pluma en su presentación cutánea^{25, 34}
- laringotraqueítis infecciosa: las membranas diftéricas en el caso de esta enfermedad no afectan la cavidad oral ni el esófago^{25, 34}
- tricomoniasis: en esta enfermedad no hay presencia de signos respiratorios.^{25, 34}

Diagnóstico clínico

El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar a través de:

- histopatología: presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos
- aislamiento viral
- ELISA
- análisis de endonucleasas de restricción

Tratamiento

No hay tratamiento específico. Mediante un diagnóstico temprano se recomienda la vacunación sobre brote.²⁵

Prevención

La vacuna de *Poxvirus* de pollo se aplica en la membrana del ala en aves de 4 semanas de edad y en aves de reemplazo de 4 – 8 semanas antes de la producción de huevo. Las vacunas deben tener un título mínimo de 10^5 DIEP_{50%}/ml. El éxito de la vacunación depende de la potencia y pureza de la vacuna y su aplicación.²⁵

Bibliografía

1. Perkins JJ. Principles and Methods of Sterilization in Health Sciences. 2a ed. Texas: Charles C. Thomas Publisher, 1983.
2. Black S. Desinfection, Sterilization and Preservation. 4a ed. London: Lea & Febiger, 1997.
3. Suárez GF; Pérez MJ. Bacteriología general. Principios Químico Biológicos. México: Departamento de Bacteriología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1996.
4. Maxine MB. Manual de Patología Clínica Veterinaria. México: Limusa, 1984.
5. Cork SC. The Veterinary Laboratory and Field Manual. 2a ed. Nottingham: University Press, 2002.
6. Osbaldiston GW. Laboratory Procedures in Clinical Veterinary Bacteriology. University Park Press, 2000.
7. Skinner OC. Introduction to Diagnostic Microbiology. 2a ed. Indianapolis: Bobbs – Merrill Educational Publishing, 1995.
8. Trigo TF, Valero EG. Patología general veterinaria. 4a ed. México: Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2002.
9. Majno G, Joris I. Cells, Tissues and Disease. Principles of General Pathology. Massachusetts: Blacwell Science, 1996.
10. Tizard IR. Inmunología Veterinaria. 6a ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2002.
11. Rubin E, Farber JL. Pathology. 3a ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1999.
12. Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología bacterianas. México: Departamento de Bacteriología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1999.
13. Suárez GF; Pérez MJ. Bacteriología general. Principios Químico Biológicos. México: Departamento de Bacteriología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1996.

14. Gyles CL, Prescott JF, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3a ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 2004.
15. Branson D. Microbiology general. 2a ed. Illinois: Charles C. Thomas Publisher, 1990.
16. Blackall J. P; Ortiz A. M. The Presence of Nicotinamide Adenine Dinucleotide–Independent *Haemophilus paragallinarum* in México. Avian Diseases. 2003; 48:425 – 429.
17. Edwald PW. The evolution of virulence. Science. 1993; 268: 86 – 93.
18. Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar
19. Cunningham CH. Virología Practica. España: Acribia, 1999.
20. Del Castillo CE, Gómez AF. Manual de laboratorio. Practicas de Virología. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2000.
21. Duijvestijn A., Hamann A. Mechanisms and regulation of lymphocyte migration. Immunology Today. 1989; 10:23 – 28.
22. Garside P, Ingulli E, Merica R. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. Science. 1998; 281:96 – 100.
23. Rose NR. Manual of clinical laboratory immunology. 5a ed. Washington: American Association of Microbiology, 1997.
24. Weir MD, Stewart J. Inmunología. 3a ed. México: Manual Moderno, 1999.
25. Calnek BW. Enfermedades de las aves. 10a ed. México: El Manual Moderno, 2000.
26. Hudson L, Hay FC. Practical immunology. 3a ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1989.
27. Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Newcastle, presentación velogénica.
28. Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-199, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar
29. Gallagher RB. A special issue: The biology of complement. Immunology Today. 1991; 12:291 – 342.

30. Wardlaw AJ, Moqbel R. Eosinophils: Biology and role in disease. *Advances in Immunology*. 1995; 60:151 – 166.
31. Bentley GA, Milstein C. The structure of the T-cell antigen receptor. *Annual Review of Immunology*. 1996; 14:563-590.
32. Taussing MJ. *Processes in pathology and microbiology*. 2a ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1984.
33. Rose NR. *Manual of clinical laboratory immunology*. 5a ed. Washington: American Association of Microbiology, 1997.
34. Buller RM, Palumbo GJ. Poxvirus pathogenesis. *Avian Diseases*. 1991; 29: 672 – 680.
35. Winterfield RW, Reed W. Avian pox: Infection and immunity with quail, psittacine, fowl, and pigeon pox viruses. *Poultry Sciences*. 1985; 64:65 – 70.

ANEXOS



Figura 1. Lesiones en cresta (viruela seca)



Figura 2. Lesiones en cresta y barbilla (viruela seca)



Figura 3. Lesiones el laringe – traquea (viruela húmeda)

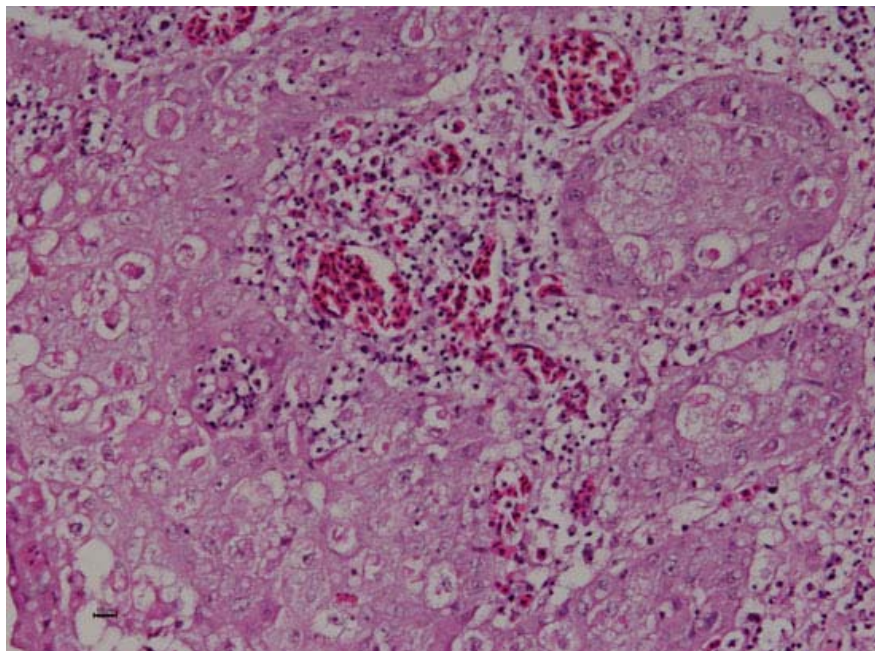


Figura 4. Hiperplasia de la mucosa de la tráquea con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinófilicos

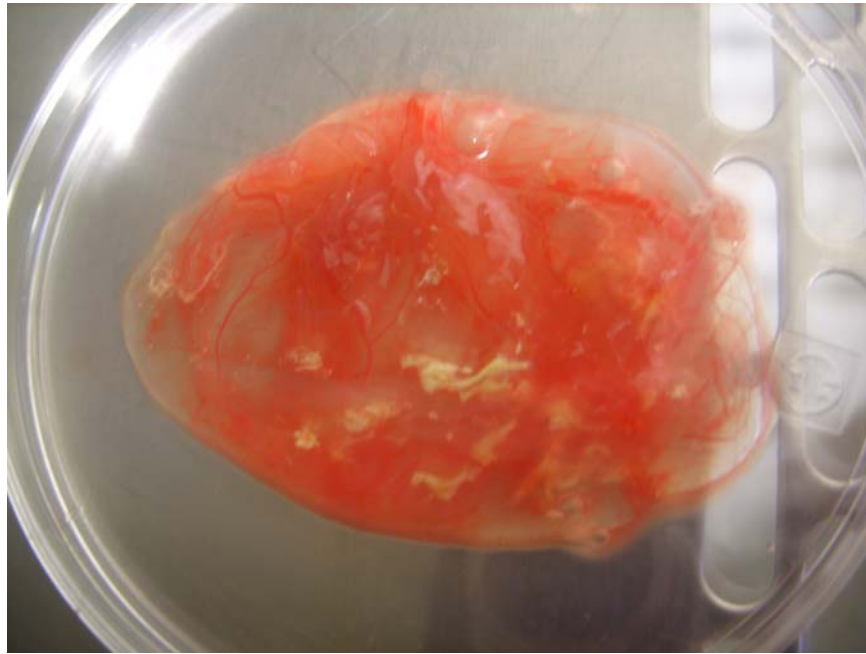


Figura 5. Aislamiento en embrión de pollo



Figura 6. Lesiones postulares proliferativas locales en el sitio de inoculación