



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

“ESTABLECIMIENTO DE MÉTODOS DE LISIS DE ERITROCITOS
PARA EL CONTEO DE LOS LEUCOCITOS DE AVE”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

REYNA COFAS CUEVAS

ASESOR: DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
 CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERNANDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"Establecimiento de métodos de lisis de eritrocitos para el conteo de los leucocitos de ave"

Que presenta la pasante Reyna Cofas Cuevas

Con número de cuenta: 09907166-8 para obtener el título de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
 Cuautitlan Izcalli, Mex. a 25 de noviembre de 2010

PRESIDENTE M.V.Z. Juan Alfonso Monroy Juárez
 VOCAL Dr. Guillermo Valdivia Anda
 SECRETARIO M.V.Z. María de la Luz Montero V.
 1er SUPLENTE MDH. Graciela Castañeda Aceves
 2º SUPLENTE M.V.Z. Víctor Manuel Petrone García

Este trabajo fue financiado y realizado gracias a los proyectos:

Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza

PAPIME PE 20077

Programas de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica

PAPIIT UNAM N° IN216005

El trabajo fue realizado con el equipo e instalaciones de:

Laboratorio 3 de “Patogenicidad Microbiana” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria
en Salud Animal, de la FESC Campo IV, UNAM.

Laboratorio de Diagnostico Integral Veterinario DIVET®

Agradecimientos

Gracias a Dios por darme esta noble vocación.

A mis padres por haber hecho hasta lo imposible porque nunca me faltara nada, por educarme, pero sobre todo por su apoyo y amor durante todos los días de mi vida...

Te amo papá, te amo mamá.

Adrian, gracias por tu apoyo durante estos años que hemos compartido y los que vienen, por ser parte de mi vida y por compartir sueños y juntos hacerlos realidad, te amo.

Fernanda, gracias por ser la niña de mi corazón y darme la dicha de ser mamá, te amo Anayanssi.

Zendy, Nidia y Jairo, gracias por su apoyo y comprensión los quiero mucho.

Dr. Valdivia gracias por su apoyo y guía durante todo este trabajo.

M. en C. Cesar Cuenca Verde gracias por su ayuda técnica brindada durante este trabajo.

Sonia y Luisa gracias por su amistad y apoyo incondicional.

Ángeles gracias por tu amistad de tantos años y tu confianza.

Liz, Paty, Rosalinda, Margarita y Tere gracias por su apoyo durante el tiempo que compartimos en la Unidad.

M.V.Z. María de la Luz Montero, MDH. Graciela Castañeda, M.V.Z. Juan Alfonso Monroy y M.V.Z. Víctor Manuel Petrone, gracias por el tiempo dedicado a leer esta tesis y por su aprobación.

UNAM gracias por mi formación académica y prepararme para el futuro.

ÍNDICE

Introducción.....	4
Métodos hematológicos.....	4
Recuento eritrocitario.....	5
Cuenta de leucocitos.....	6
Hemolisinas.....	6
Antecedentes de la hematología aviar	8
Biometría hemática.....	10
Estudio del frotis teñido.....	10
Células sanguíneas.....	12
Objetivo general.....	13
Objetivos particulares.....	13
Hipótesis.....	13
Justificación.....	13
Materiales y métodos	
a) Método químico.....	14
b) Método microbiológico.....	15
Resultados	
a) Método químico.....	18
b) Método microbiológico.....	25
Discusión	
a) Método químico.....	36
b) Método microbiológico.....	37
Conclusión.....	40
Bibliografía.....	41

INTRODUCCIÓN

La hematología es el estudio de la sangre y de los tejidos que forman, acumulan o hacen circular las células sanguíneas. La sangre es esencial para mantener el correcto equilibrio de electrolitos y agua, para el control de la temperatura y para el funcionamiento del sistema inmunológico. Es relativamente más sencillo obtener una muestra de sangre que de un tejido más denso o profundo. ¹

El volumen total de la sangre varía entre especies, incluso entre distintas razas o tipos de la misma especie, además, el volumen general de fluidos es normalmente mayor en los animales jóvenes o delgados que en aquellos que tienen un porcentaje mayor de grasa. ¹ Todas las células sanguíneas tienen una vida media finita, pero en los animales sanos el número de células en circulación se mantiene en un nivel constante. ²

Todos los análisis de sangre comienzan con una correcta obtención de la muestra de sangre: una incorrecta obtención y manipulación de la muestra puede llevarnos a resultados poco fiables, o, algo mucho peor, erróneos. ¹ Los eritrocitos comprenden alrededor de la mitad del volumen total de la sangre. Son elementos sumamente especializados. Los rasgos morfológicos de los eritrocitos maduros de perros, gatos, caballos y rumiantes son generalmente muy parecidos por lo que se refiere a la ausencia de núcleos, la coloración rojiza o rojizo-anaranjada y el hecho que sean generalmente células con forma discoidal bicóncava. La palidez central es el área de coloración más clara en el centro de la célula, debida a una estrecha asociación de las membranas en esa parte. ²

Métodos hematológicos

Entre los principales exámenes hematológicos encontramos: preparación y evaluación del frotis teñido, evaluación de la hemoglobina, determinación del volumen del hematocrito (Ht), recuento de eritrocitos y recuento total y diferencial de leucocitos, además de recuento de plaquetas, velocidad de sedimentación, pruebas de coagulación y color del plasma. ³

Una parte esencial de cualquier evaluación hematológica es el examen microscópico de la extensión de sangre, independientemente del método empleado para contar las células. La forma, tamaño y las características de las células y las plaquetas proporcionan una información vital para caracterizar los procesos patológicos. ⁴

Recuento eritrocitario

El recuento de los glóbulos rojos se puede llevar a cabo con sangre capilar o venosa. Debido a la enorme población de eritrocitos en la sangre de todos los animales sanos, el cómputo es solo posible cuando se ha efectuado una dilución en grado razonable. Para este propósito se necesitan diluyentes apropiados y pipetas. Los diluyentes recomendados incluyen el de Hayem (cloruro de sodio, 1g; sulfato sódico, 5g; agua destilada, 200ml, ocasionalmente se filtra) y de Dacies (99 ml de solución acuosa de citrato sódico al 3%; 1ml de formaldehído al 40%), los cuales, además de protegerlos, preservan la forma de los eritrocitos. Son útiles las macro y micropipetas calibradas para las diluciones.³

Algunos investigadores sugieren que las diluciones más elevadas proporcionan recuentos más exactos. En el recuento de glóbulos rojos se utiliza la pipeta de Thoma para la dilución de hematíes, mientras se toma la sangre la pipeta se debe mantener en una posición casi horizontal, hasta que la columna de sangre alcanza la marca 0.5 del vástago, la pipeta se introduce en el frasco que contiene el diluyente de Hayem, se succiona hasta la marca 101. Se debe agitar la pipeta durante unos 2 minutos. El bulbo de la pipeta contiene sangre a una dilución de 1 por 200. Se dispone de una gran variedad de hemocitómetros, siendo los más adecuados los que poseen dos cámaras separadas por un canal central y la cuadrícula mejorada de Neubauer.³

Los eritrocitos se cuentan con un objetivo de 40X, y con objeto de asegurarse que se aplica sobre un grupo de células razonablemente representativo, se recomienda seleccionar los grupos de las 4 esquinas y el grupo central de los 16 cuadros mas pequeños, sumando 80 del total de los 400 cuadros.³

El cálculo de la población de eritrocitos por mm^3 se hace multiplicando el número de células contadas (R) por el factor dilución y el factor volumen. En el recuento se incluyeron un total de 80 cuadros, es decir $1/50\text{mm}^3$. El factor dilución era 200, con lo que el recuento total de eritrocitos por mm^3 se obtiene como sigue:

$$200 \times 50 \times R \text{ células } 10\,000 \times R$$

Incluso con cierta experiencia y una técnica estándar, el margen de error es por lo menos del 5%, o sea, 250,000 en un recuento de 5, 000,000. En los laboratorios especializados

en trabajos hematológicos se pueden llevar a cabo gran número de recuentos de células sanguíneas en una forma estandarizada por medio de un equipo de recuento electrónico.³

Cuenta de leucocitos

Para hacer la cuenta de glóbulos blancos se requiere sangre venosa. Para llenar la pipeta, se toma con la mano derecha, se inserta en la sangre y se succiona con cuidado hasta que la columna de sangre alcance la marca de 0.5, se quita el exceso de sangre de la misma mediante un poco de gasa o de algodón, posteriormente se aspira el diluyente de Turk, lentamente hasta la marca 11. Se agita la pipeta por un espacio de dos minutos con el objeto de lograr una distribución correcta de las células en el líquido. Para contar los leucocitos, se enfoca con el objetivo seco débil sobre el cuadro grande situado en la esquina superior izquierda. Cuéntese los leucocitos que se encuentren existentes en los tres cuadros restantes. La suma total de los cuatro cuadros grandes, multiplicada por 50 da la cifra total.⁵

Hemolisinas

Las bacterias patógenas son capaces de vencer mecanismos de defensa del cuerpo del hospedador y de invadir y multiplicarse en los tejidos. Las bacterias patógenas producen toxinas y enzimas que causan la destrucción y la muerte de los tejidos celulares, originando signos clínicos de enfermedad y ocasionalmente la muerte del animal infectado.⁶

Estudios sobre la hemolisina (Bernheimer, 1947) indican que este material es enzimático. No se conoce los sustratos en los que estas enzimas residen. Con toda probabilidad, los sustratos actúan como antígenos, lo que explica el porque las hemolisinas han sido clasificadas como toxinas.⁷ Las hemolisinas lisan los eritrocitos, algunas lisan también otros tipos de células, incluidas células fagocíticas. Las reacciones hemolíticas y modos de acción de las diversas hemolisinas varían. Como en el caso de *Staphylococcus aureus*, las toxinas alfa, delta y epsilon producen zonas de hemólisis completa en agar sangre de cordero, mientras que la toxina beta produce una zona hemólisis incompleta.⁶

La toxina alfa se secreta como una proteasa inactiva, la cual, después de su activación por una enzima proteolítica unida a la membrana, hidroliza las proteínas estructurales de la membrana de los eritrocitos. La toxina alfa es la más potente de las cuatro toxinas de membrana hemolíticas producidas por *S. aureus*.⁶

La toxina beta degrada por hidrólisis la esfingomielina de la membrana de los eritrocitos. La susceptibilidad de un glóbulo rojo a la esfingomielinasa esta relacionada directamente con la cantidad de esfingomielina a la que puede acceder la toxina. ⁶

La toxina delta lisa los eritrocitos por una actividad semejante a la de los detergentes. ⁶ La hemolisina delta es un péptido hemolítico producido por *Staphylococcus*, y se ha estudiado por casi 50 años. Por lo tanto, se ha convertido en un modelo en el estudio de los péptidos que obraban recíprocamente con las membranas. La hemolisina delta es un péptido de 26 aminoácidos, algo hidrofóbico y presenta una carga neta de cero. ⁸

Algunas hemolisinas se encuentran íntimamente relacionadas. ⁶ Los estreptococos del grupo A, por ejemplo, elaboran dos hemolisinas, que difieren de sus propiedades químicas y en el modo de producir la lisis de los eritrocitos. Estas hemolisinas se denominan estreptolisina O y estreptolisina S. ⁷ La estreptolisina O es una hemolisina sensible al oxígeno. ⁶ Puede ser reactivada mediante agentes reductores, como el hidrosulfito sódico. Este tipo de hemolisina es producida por muy diversas especies de bacterias. Se neutraliza con los sueros específicos y con el colesterol. ⁷ La produce numerosos estreptococos patógenos y se encuentra antigénicamente relacionada con otras muchas hemolisinas, incluidas la neumolisina de *S. pneumoniae*, la botulinolisina de *Clostridium botulinum*, la tetanolisina de *C. tetani*, la chauveolisina de *C. chauvoei* y la toxina theta de *C. perfringens*. ⁶

La estreptolisina S es una lipoproteína que no se neutraliza con el colesterol y cuyo proceso de oxidación no es reversible. Esta hemolisina produce efectos degenerativos sobre el músculo cardíaco y otros órganos parenquimatosos, así como hemólisis. ⁷

El *Streptococcus pneumoniae* produce una hemolisina intracelular perteneciente a la familia de las hemolisinas tiol-dependientes comúnmente denominada neumolisina. Esta constituye la citolisina principal de *S. neumoniae* y es conocida como uno de sus factores de virulencia y considerada por muchos investigadores como candidato antigénico para las técnicas serológicas empleadas en el diagnóstico de este microorganismo. ⁹

Según estudios realizados por Kanclerski y Mollby, la mayoría de las cepas de *S. neumoniae* producen neumolisinas y éstas pueden ser obtenidas en el laboratorio mediante el empleo de métodos simples de purificación. ⁹

Las bacterias producen a menudo una variedad de toxinas citolíticas, que permiten a los microorganismos infectar con éxito al hospedador incluyendo los seres humanos y otros

animales. *Escherichia Coli*, expresando la hemolisina E puede causar la lisis de glóbulos rojos de diversas especies, incluyendo los seres humanos, el caballo, las ovejas, la cabra y la gallina.¹⁰

Las hemolisinas producidas por cepas de *E. coli* son proteínas tóxicas extracelulares (exotoxinas) que rompen la membrana de los eritrocitos y de otras células eucarióticas. Aunque se ha llegado a relacionar con patogenicidad, la función precisa que juegan las hemolisinas en la patogénesis es desconocida, y más aún, se considera como una característica inespecífica por considerar que también puede ser causada por proteínas extracelulares diferentes y no relacionadas a las hemolisinas, o por otros compuestos que actúan sobre los eritrocitos.¹¹

Existen evidencias claras que demuestran la relación de las hemolisinas con patogenicidad en bacterias gram positivas, pero en gram negativas su significado es aún controversial; en el caso de *E. coli*, un pequeño porcentaje de cepas aisladas del intestino de individuos sanos y con diarrea son hemolíticas, aunque cepas de *E. coli* hemolíticas frecuentemente están presentes en infecciones extraintestinales.¹¹

Serratia marcescens producen dos tipos de hemolisinas: hemolisina entrar en contacto con-dependiente y hemolisina extracelular. La hemolisina Sh1A tiene efecto citolítico y entra en contacto con-dependiente con la actividad hemolítica, pero poco se sabe sobre la hemolisina secretada por *Serratia marcescens*. Un tipo de hemolisina y de citolisina es un grupo de toxinas de formación de poros. Este tipo de toxina forma típicamente un homooligómero actúa cambiando la permeabilidad de la célula y llevando a la muerte celular.¹¹

Antecedentes de la hematología aviar

La hematología aviar tuvo sus inicios a principios de 1960, como una herramienta en la investigación en la industria de las aves de corral. En general, los principios básicos de la hematología en mamíferos se aplican en la hematología aviar, con pocas diferencias y modificaciones. La mayor diferencia entre la hematología de mamíferos y aves, incluye la presencia de eritrocitos nucleados, trombocitos y heterófilos en la sangre periférica del ave. La modificación de estos procesos incluye el uso de un manual con las técnicas, para la obtención de un conteo celular exacto. Estos procedimientos son una labor intensiva y de exactitud, los resultados dependen de la experiencia y habilidad del desempeño individual del análisis.¹³

La sangre de las aves, al igual que la sangre de mamífero, puede producir una cantidad valiosa de información. El desarrollo de microtécnicas en los años recientes, han significado que pequeñas muestras pueden ser analizadas con precisión.¹⁴

El uso de la hematología como auxiliar en el diagnóstico de las enfermedades de las aves ha tenido un incremento rápido. Esto puede ser atribuido seriamente a un incremento en el número de aves como mascotas, que tienen un valor monetario y sentimental.¹⁵

La hematología es un herramienta de diagnóstico en la clínica, puede proporcionar información de los diferentes procesos de enfermedad del paciente¹⁵, mediante la identificación y evaluación de las células de ave es posible una respuesta y es una herramienta que ayuda a la discriminación de la enfermedad o de la salud en los pacientes, así como un monitor de la severidad de la progresión clínica de la enfermedad.¹⁷ De esta manera el examen de la sangre puede ser esencial en el establecimiento del diagnóstico.¹⁸

Los valores normales de cualquier parámetro de hematología aviar tienen un rango amplio debido a la influencia de varios factores intrínsecos y extrínsecos.¹³

El total del volumen sanguíneo de un ave es aproximadamente el 10% de su peso corporal,¹⁴ siendo los sitios más comunes de recolección de sangre la vena yugular derecha, la vena metatarsiana medial y la vena radial.¹⁹ La sangre así extraída se puede colocar en tubos capilares para microhematocrito y ser centrifugadas, para la determinación del volumen del paquete celular.²⁰

Los métodos de conteo celular no están estandarizados entre los laboratorios que realizan el conteo completo de la sangre de aves. Las técnicas y las investigaciones son variadas y aproximadas. Frecuentemente la literatura hace referencia al EDTA como el anticoagulante de elección para el conteo de células aviares. Sin embargo, el EDTA puede causar hemólisis en las células rojas de variadas muestras de sangre, incluido, sangre de avestruz, cuervo, guaco y grulla. Algunas investigaciones están en contra de recomendar el uso de heparina, por que agrupa las células en el hematocitometro, pero algunos laboratorios veterinarios recomiendan este método anticoagulante.²¹

El estudio hematológico controlado usualmente involucra poblaciones estables, técnicas de muestreo estandarizado y un rápido análisis especializado. El control de las variables ciertamente reduce la introducción de errores en el laboratorio, particularmente cuando comparamos metodologías. Después de 24 horas todos los tipos de anticoagulantes

(EDTA, heparina y citrato) resulta en la reducción de la calidad de la célula cuando son examinadas en el hematocitometro. En conjunto el EDTA en la sangre degenera más que otros tipos. La muestra en refrigeración disminuye la regeneración celular.²¹

Biometría hemática

La biometría hemática aviar representa una colección de pruebas de análisis de las cantidades, la calidad, y la morfología de los elementos celulares, además de la prueba seleccionada en el plasma.²¹

Es usado el microhematocrito para determinar el volumen del paquete celular. Este es el método mas comúnmente utilizado para la estimación de células rojas. La determinación del volumen del paquete celular, comienza con la colocación de sangre con anticoagulante en un tubo capilar. Normalmente se centrifuga a 5 minutos, causando la separación de la sangre en el paquete de células rojas, capa leucocitaria y plasma. Las muestras de sangre con un alto valor en el paquete de volumen celular, puede requerir más tiempo de centrifugación para obtener un apropiado valor de paquete celular.²¹

El hematocrito (volumen del paquete celular) disminuye constantemente con el envejecimiento de las muestras de sangre. Las proteínas plasmáticas se pueden medir por medio del refractómetro, a partir del tubo capilar centrifugado.²¹

Estudio del frotis teñido en las aves.

El conteo de glóbulos rojos se obtiene ya sea de forma automatizada o por método manual²², pero en las aves, reptiles, anfibios y peces los eritrocitos son nucleados y el conteo manual es necesario mediante la cámara de Neubauer en vez del conteo electrónico, ya que así se obtendrá una mejor estandarización.²³ En el frotis sanguíneo de ave se observan eritrocitos nucleados, leucocitos y trombocitos.¹⁵

Existen dos métodos para obtener el conteo total manual de glóbulos rojos: Unopette y Natt y Herrick.²¹ Numerosas instituciones y zoológicos prefieren el conteo celular por el método de Natt y Herrick. Se usa como diluyente el colorante metil-violeta 2B, que tiñe a las células sanguíneas. A diluciones de 1:200, este diluyente es aplicado en la cámara de Neubauer, el hematocitometro es colocado en un ambiente húmedo por cinco minutos para permitir que las células se establezcan. Todos los eritrocitos son contados de los cinco cuadros

grandes y se multiplica por 10 000 y así se obtiene el conteo por microlitro de sangre. De los nueve cuadros de la misma cámara se cuentan los leucocitos que están teñidos de negro. El total de leucocitos contados en un microlitro se calculan de la siguiente manera:

$$(\text{Conteo total} + 10\% \text{ del conteo total}) \times 200$$

El método Natt y Herrick puede ser modificado para contar un estimado de los trombocitos, en la experiencia del autor este método es más difícil, por que hay que realizar constantes repeticiones.²¹

El método más popular para la semicuantificación de leucocitos es el método Unopette 5877. Con la pipeta se toman 25 μl de sangre²⁰ esta muestra de sangre se diluye a razón de 1:32 con la solución de la floxina B¹¹ esta mezcla se suministra a la cámara, solamente los heterófilos y los eosinófilos, absorben la floxina B. Después de un período de cinco minutos de reposo todas las células son teñidas y son contadas en los 18 cuadros (ambos lados de hematocitometro). El total de los heterófilos y eosinófilos se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Células contadas} \times 10 \times 32 / 18$$

El total del conteo de leucocitos tanto de eosinófilos como de heterófilos, se usa para sacar el conteo diferencial entre estos, se calcula de la siguiente manera.²⁰

$$\text{Heterófilos y eosinófilos totales} / (\% \text{ heterofilos y } \% \text{ eosinofilos}) \times 100^3$$

Hay que poner importancia en que la mezcla de la sangre con la floxina B sea la adecuada, por que las células rojas pueden también teñirse si se prolonga esta exposición.¹³

Ambos métodos hematocitometricos requieren de una estricta atención del tiempo. El fracaso da cómo resultado la sobretinción de las células. La sobretinción en el método Unopette, nos da como resultado que las células no se puedan contar y no se pueden diferenciar. La sobretinción en el método de Natt y Herrick resulta en una gran dificultad para la diferenciación de los tipos celulares.

Ambos métodos se afectan desfavorablemente por la deshidratación cuando se cuentan en la cámara. Las muestras de sangre que llegan al laboratorio con una decreciente calidad celular, afecta negativamente el conteo de células en el hematocitometro. En general, la cuenta baja de células ocurre por muestras viejas o deterioradas. Estudios controlados demuestran el

incremento de variabilidad del método Natt y Herrick comparado con el método Unopette. Sin embargo otros estudios se oponen a esta conclusión. ²¹

Células sanguíneas

Los glóbulos rojos de las aves son ovalados, alargados, grandes y contienen un núcleo oval. Los frotis teñidos mediante el colorante de Wright o cualquier otro procedimiento policromo muestra el citoplasma de color rosa amarillento y el núcleo púrpura. Unos cuantos glóbulos rojos son ovalados anchos y contienen núcleos que son menos alargados, con cromatina plenamente visible en forma de masas. El citoplasma de estas células es menos rosado, apareciendo en ocasiones de color azul. Estos reciben el nombre de eritrocitos policromos y son células jóvenes que probablemente corresponden a la etapa de normoblastos de los eritrocitos de los mamíferos. Su presencia en mayor cantidad es sugestiva de anemia. ¹

La célula polimorfonuclear del ave representa una afinidad tintoreal diferente de la que muestra la mayoría de los mamíferos. El leucocito polimorfonuclear contiene en su citoplasma gránulos alargados, ovalados de color rojo, que semejan cristales y se tiñen por los procedimientos hematológicos usuales. Estos se denominan seudoeosinófilos o heterófilos en lugar de neutrófilos. ¹

Los eosinófilos constituyen otro grupo de células de las aves que contienen gránulos rojizos en el citoplasma, y reciben el nombre por ser similares a los eosinófilos mamíferos. Los gránulos son esféricos y generalmente se tiñen de color rojo ladrillo, en contraste con el color rosado de los gránulos de los heterófilos. ¹

Los basófilos se hallan presentes en la sangre de las aves y son semejantes, en muchos aspectos, a los correspondientes a los mamíferos. Los linfocitos y los monocitos difieren poco de los del mamífero. Los linfocitos varían de pequeñas formas con escaso citoplasma a formas grandes con gran cantidad de citoplasma. Al igual que el mamífero, el núcleo del monocito suele ser más pálido y su red de cromatina más fina que el del linfocito. El citoplasma del monocito suele ser más nebuloso y vacuolado en las aves. ¹

Los trombocitos son células nucleadas, menos que los eritrocitos y contienen un núcleo circular. El citoplasma es muy claro y casi incoloro. En uno de los extremos del citoplasma presentan unos cuantos gránulos de color rojo. ¹³

El conteo de método manual puede tener un error del 10%.¹³ Las aves poseen eritrocitos nucleados, lo que impide el conteo de los leucocitos, en el método automatizado.²¹ La presencia de eritrocitos nucleados y trombocitos en la sangre de ave presenta un desafío al tratar de aplicar el aparato automatizado.¹³

OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferentes métodos de lisis selectiva en células sanguíneas de ave, que permitan la destrucción de eritrocitos sin afectar a los leucocitos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la dilución óptima de ácido acético y cloruro de sodio que permita lisar sólo a los eritrocitos sin afectar a los leucocitos.
2. Aislar y caracterizar cepas bacterianas que causen hemólisis en eritrocitos de ave.
3. Seleccionar cepas bacterianas productoras de hemolisinas que provoquen destrucción de eritrocitos sin alterar a los leucocitos de las aves.
4. Determinar la actividad específica de las hemolisinas producidas por las cepas.

HIPÓTESIS

Si se emplea una sustancia que cause lisis selectiva a eritrocitos de ave, ésta facilitara el conteo de los leucocitos durante la cuenta celular en la biometría hemática.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de la sangre en las aves se realiza por métodos manuales, basado en los principios de la hematología de los mamíferos, la principal diferencia que existe entre ambos es que en las aves los eritrocitos son ovalados y contienen un núcleo oval, mientras que en los mamíferos son células con forma discoidal bicóncava con ausencia de núcleo. En la biometría hemática en mamíferos se utilizan técnicas que lisan al eritrocito sin mayor problema, ya que al carecer de núcleo los vuelve más vulnerables a las sustancias utilizadas en estos métodos para realizar las cuentas totales, no es de la misma manera para la sangre de ave ya que el eritrocito al contar con núcleo, las sustancias no son capaces de lisar al eritrocito al menos en

las mismas concentraciones empleadas en mamíferos. En la actualidad no se cuenta con una sustancia capaz de hacer lisis en los eritrocitos, sin alterar a los leucocitos. En la práctica dentro del laboratorio clínico se utilizan métodos manuales para realizar los recuentos celulares, éstos son como Unopette y Natt y Herrick, el primero tiñe solo a los heterófilos y eosinófilos mientras que la segunda tiñe a los eritrocitos y leucocitos, permitiendo un conteo simultáneo, el inconveniente de ambas técnicas es la semicuantificación de los leucocitos, además de que la deshidratación de la muestra afecta el conteo en la cámara, también se requiere de habilidad y experiencia en la observación de las muestras de sangre de ave. Por si fuera poco, los rangos en animales sanos no están estandarizados y solo son aproximados. Contando con una sustancia que realice la lisis selectiva, favorecerá y facilitará la cuantificación de los leucocitos y además de que permitirá posteriormente la utilización del aparato automatizado de biometría hemática, ya que al lisar a los eritrocitos de estas muestras, se podrá realizar un conteo más exacto de los leucocitos, reduciendo así el tiempo del proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Obtención de sangre de ave

Para este trabajo se utilizó un gallo doméstico *Gallus gallus*, raza híbrida, clínicamente sano, de 2.5 Kg de peso, de 1 año de edad. Se obtuvo la sangre de la vena radial en tubos con anticoagulante EDTA.

a) Método químico.

El trabajo corresponde con una investigación experimental, observacional y prospectiva.

Determinación de la dilución óptima de ácido acético y cloruro de sodio que permita lisar sólo a los eritrocitos de ave sin afectar a los leucocitos.

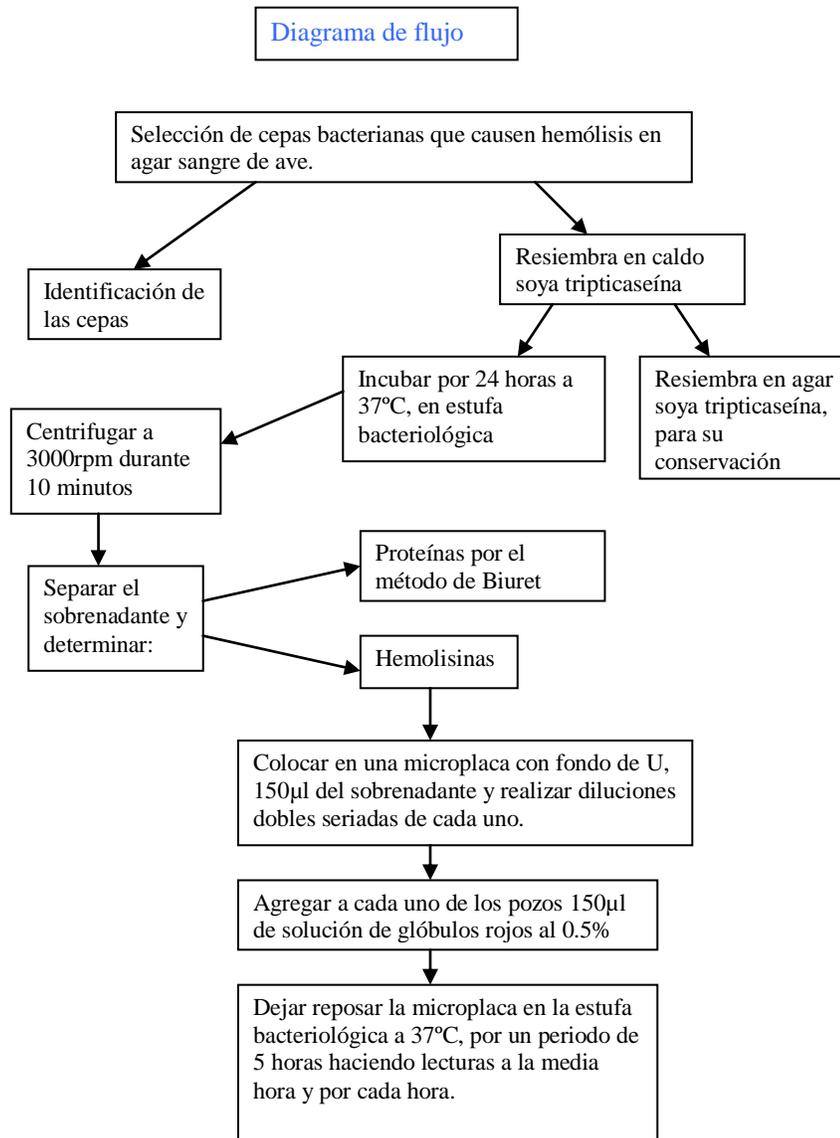
Se realizaron dos repeticiones de cada una de las diluciones de ácido acético, estas fueron porcentuales y decimales quedando al final como: 16%, 8%, 4%, 2%, 1.6%, 1%, 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.16%, 0.1%, 0.08%, 0.05%, 0.04%, 0.02%, 0.01%, 0.005%, 0.0025% y 0.00125% y 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Mientras que con el NaCl se realizaron de igual manera dos repeticiones de cada una de las diluciones porcentuales de 2%, 1%, 0.5%, 0.25% y 0.125%. A cada una de estas diluciones se les agregaron 0.1ml de sangre de ave. Se incubaron a

temperatura ambiente durante 5 minutos, posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm en una centrífuga clínica (Clay Adams) por 5 minutos, se separo el sobrenadante del sedimento de cada tubo y se midió la cantidad de hemoglobina a 540nm mediante un espectrofotómetro Spectronic 20D, por el método de cianometahemoglobina³, posteriormente se multiplico por el factor 28.7 para obtener la cantidad de hemoglobina en g/dl, mientras que con los sedimentos se realizaron frotis que se fijaron con metanol, se tiñeron con la técnica de Wright y se observaron al microscopio para evaluar la morfología de las células sanguíneas.

b) Método microbiológico

Para el aislamiento y caracterización de cepas bacterianas que causen hemólisis en eritrocitos de ave se utilizó el diagrama mostrado en la figura N°1.

Figura N°1. Diagrama de flujo de la metodología utilizada para obtener las cepas hemolíticas



Se seleccionaron cepas bacterianas productoras de hemolisinas de fuentes como heces y cavidad oral de aves, estas se sembraron en agar sangre de ave al 3%, y se incubaron a 37°C por 24 horas. Subsecuentemente se midió el halo de hemólisis, las cepas que presentaron un halo mayor se resembraron en agar soya Trypticaseína (AST) (Bioxon) para su identificación bioquímica.

Las cepas fueron codificadas de la siguiente manera: RCC1, RCC2, RCC3, RCC4, RCC5, RCC6, RCC7, RCC8, RCC9.

Caracterización de las cepas

Se realizaron pruebas bioquímicas²⁴ para la caracterización de las cepas utilizadas, las pruebas fueron (Bioxon): catalasa, oxidasa, Oxido/Fermentación (O/F), Motilidad/Indol/Ornitina (MIO), Rojo de Metilo/ Voges-Proskauer (MR/VP), Agar Lisina Hierro (LIA), sorbitol, citrato, urea, Triple Azucar Hierro (TSI) y leche tornasol. Una vez realizado fueron resembradas a tubos con agar soya tripticaseina (AST) para su conservación.

Determinación de hemolisinas y su efecto

Las cepas que mostraron lisis sobre el medio de agar sangre con eritrocitos de ave se resembraron en Caldo Soya Trypticaseína (CST) y se incubaron a 37°C por 24 horas, después el caldo se centrifugo a 3,000rpm durante 10 minutos y se separo el sobrenadante del sedimento, en el sobrenadante se determino la cantidad de proteínas totales por el método de Biuret²⁵, y se determinaron la hemolisinas a través de un método en microplacas.

Se preparó una solución de glóbulos rojos al 0.5%, para realizar esto se diluyo 0.5 ml de sangre de ave obtenida con EDTA en 99.5ml de Solución Salina Fisiológica (SSF) al 0.85%.

En una microplaca con fondo de U, se coloco el sobrenadante del CST, en el primer pozo de la microplaca se colocaron 150µl de sobrenadante, en el segundo se colocaron 150µl de sobrenadante mas 150µl de SSF, de aquí se comenzaron las diluciones dobles seriadas las cuales quedaron de la siguiente manera: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, hasta llegar al pozo numero 10. Se utilizaron dos controles uno positivo que fue el agua destilada y negativo que fue la SSF. A cada uno de estos pozos se le agregaron 150µl de solución de glóbulos rojos al 0.5%. Esta placa se dejo reposar dentro de la estufa

bacteriológica a 37°C por 5 horas, haciendo lectura de las hemolisinas cada hora. Se determino la actividad de la hemolisina producida por las cepas mediante la observación en el cambio de color del sobrenadante y se selecciono la que tuvo la mayor actividad. Se realizaron dos repeticiones de cada una de las diluciones.

A los mismos tiempos se tomaron 50 µL del sedimento y se realizaron frotis de cada dilución para su tinción y evaluación al microscopio.

RESULTADOS

Método químico

Se realizo la lectura de hemoglobina por el método de cianometahemoglobina³ de cada uno de los sobrenadantes de las concentraciones de ácido acético adicionadas con sangre de ave, en las cuales se pudieron observar los distintos datos, mostrados en el cuadro N°1. Se puede observar que la mayor liberación de hemoglobina se dio en las concentraciones 0.8%, 0.16%, 0.1% y 0.005% en la cuales obtuvimos resultados de 54.5g/dl, 57.4g/dl, 53.1g/dl, y 44.8g/dl respectivamente. También se realizo le lectura de las concentraciones decimales del sobrenadante del ácido acético, las cuales se observan en el cuadro N°2, en estas observamos que en la concentración al 10⁻¹ se obtuvo la mayor liberación de hemoglobina con 53.1g/dl. Nótese que en ambas concentraciones tanto porcentuales como decimales el rango en la mayor liberación de hemoglobina se da entre 57.4g/dl y 44.8g/dl.

Posteriormente se realizaron frotis de cada una de los sedimentos de la mezcla de sangre con las concentraciones de ácido acético, los resultados se presentan en el cuadro N°3, En general podemos observar alteración de los eritrocitos (figura 1), se aprecian leucocitos que comienzan a presentar un daño, no se pueden diferenciar las distintas líneas celulares, solo los heterófilos, pero no en todos los frotis. Estas concentraciones no tienen el efecto de lisis selectiva requerida. En la observación de los frotis del sedimento de las concentraciones decimales observadas en el cuadro N°4, se observaron grumos y solo en la concentración 10⁻⁴ se aprecian núcleos libres.

Además se realizo la lectura de hemoglobina por el método de cianometahemoglobina³ de cada uno de los sobrenadantes de las concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) adicionadas con sangre de ave, estos resultados se muestran en el cuadro N°5. En estos

podemos observar que el valor más elevado de hemoglobina se obtuvo en la dilución 0.5% con una liberación 37.3g/dl y por debajo en la concentración de 0.25% con una liberación de 27.7g/dl. Las observaciones de los frotis expuestas en el cuadro N°6 de los sedimentos de estas mismas concentraciones, en general, observamos con esta técnica la conservación de la morfología de los eritrocitos, así como de núcleos sueltos de estos mismos, solo en la concentración al 1% se observa pérdida de citoplasma de los eritrocitos, y en otras el citoplasma esta hinchado (figura 2).

Cuadro N°1. Liberación de hemoglobina por eritrocitos de ave tratados con soluciones de ácido acético

Concentración de ácido acético (%)	Hemoglobina (g/dl)
16	11.8*
8	12.0
4	11.3
2	14.0
1.6	26.0
1	22.6
0.8	54.5
0.4	49.6
0.2	48.5
0.16	57.4
0.1	53.1
0.08	11.1
0.05	32.7
0.04	19.1
0.02	28.1
0.01	17.7
0.005	44.8
0.0025	4.2
0.00125	18.9
0.0	19.25

*Los datos son el promedio de dos repeticiones.

CUADRO N° 2. Liberación de hemoglobina por eritrocitos de ave tratados con soluciones de ácido acético

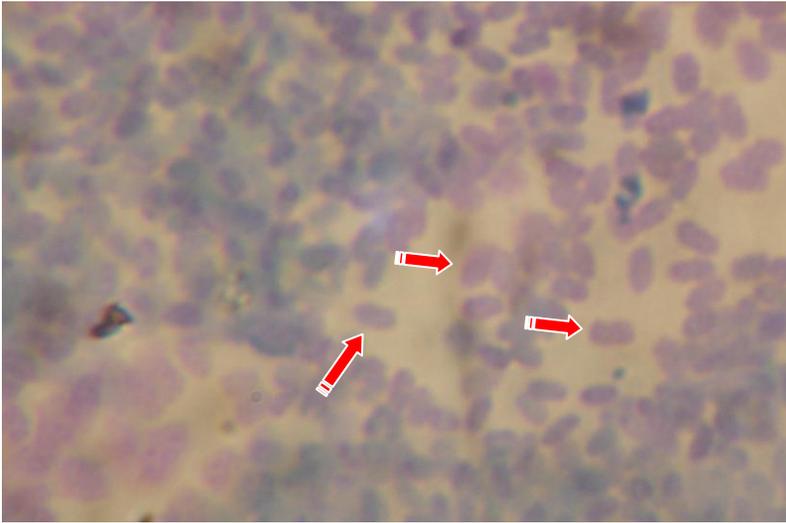
Concentración de ácido acético	Hemoglobina (g/dl)
10^{-1}	53.1*
10^{-2}	33.9
10^{-3}	31.3
10^{-4}	36.2
10^{-5}	28.8

*Los datos son el promedio de dos repeticiones.

Cuadro N° 3. Evaluación de las células sanguíneas de ave, posterior al tratamiento con diversas concentraciones de ácido acético.

Concentración de ácido acético (%)	Observaciones
16	A los eritrocitos no se les observa el núcleo y hay núcleos libres, otros sin alteraciones. Los leucocitos se observan con núcleos de coloración azul.
8	Se aprecian eritrocitos a los cuales no se aprecia el núcleo, además hay núcleos libres y dan la apariencia de contener un puntillero basófilo. Leucocitos solo se observan núcleos redondeados basófilos.
4	Aspecto grumoso del frotis en una parte. Los eritrocitos se aprecian sin núcleo. Leucocitos redondos de color morado.
2	Eritrocitos con citoplasma hinchado, núcleo bien delimitado y núcleos sin citoplasma en gran cantidad. Leucocitos se observan de núcleo morado a lila, hay poca cantidad.
1.6	En un 90% de los eritrocitos no se observa el núcleo, en un 10% si se observan, citoplasma bien delimitado. En los leucocitos se observan bien delimitados su citoplasma y núcleo, mientras que a otros se les observa el núcleo fragmentado con puntillero basófilo.
1	No se observan los eritrocitos. Los leucocitos se observan con núcleo morado y se ven algunos heterófilos.
0.8	A los eritrocitos no se les observa el núcleo, aumentados de tamaño, perdieron su forma, se ven más o menos redondeados. Se aprecian algunos heterófilos bien delimitados, los demás leucocitos se ven redondos y morado.
0.4	A los eritrocitos no se les observa el núcleo. Leucocitos se observan redondos y morados.
0.2	Se observan poca cantidad de eritrocitos. Los leucocitos se observan redondos a algunos se les ve el núcleo.
0.16	Se observan poca cantidad de eritrocitos. Leucocitos se ven redondos y morados a algunos se les aprecia el núcleo.
0.1	Ausencia se células.
0.08	Ausencia se células.
0.05	Ausencia se células.
0.04	Destrucción de eritrocitos, algunos están redondos. No se observan leucocitos.
0.02	Ausencia se células.
0.01	Eritrocitos redondos sin núcleo y núcleos libres. Se observan muy pocos leucocitos.
0.005	Ausencia se células.
0.0025	Ausencia se células.
0.00125	Ausencia se células.
0	Solo se observan unas estructuras redondas de color rosa. No se distingue el tipo.

Figura N° 1. Imagen del sedimento de la sangre tratada con ácido acético al 1.6%.



➡ Eritrocitos con alteración el núcleo.

La misma actividad se observó en las concentraciones al 16%, 8%, 4%, 1.6%, 0.8%, 0.4% y 0.01%.

Cuadro N° 4. Evaluación de las células sanguíneas de ave, posterior al tratamiento con diversas concentraciones de ácido acético

Concentración de ácido acético	Observaciones
10^{-1}	Ausencia de células.
10^{-2}	Hay acumulación de células. No se distinguen los tipos celulares.
10^{-3}	Hay acumulación de células, pero no se definen, se aprecian núcleos libres.
10^{-4}	Se observa gran cantidad de núcleos sin citoplasma.
10^{-5}	Hay acumulación de células, pero no se definen.

Cuadro N°5 Liberación de hemoglobina por eritrocitos de ave tratados con soluciones de NaCl.

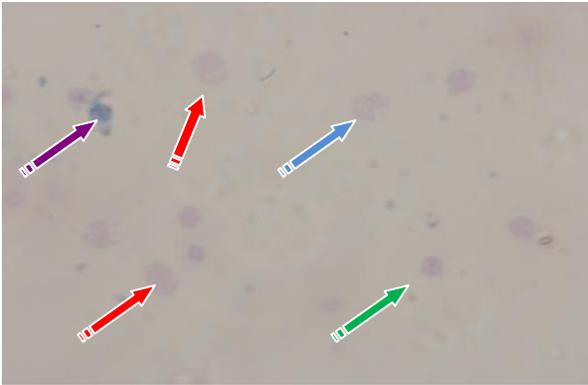
Concentración de NaCl (%)	Hemoglobina (g/dl)
2	10.0*
1	7.7
0.5	37.3
0.25	27.7
0.125	11.9

*Los datos son el promedio de dos repeticiones.

Cuadro N° 6 Evaluación de las células sanguíneas de ave, posterior al tratamiento con diversas concentraciones de NaCl.

Concentración %	OBSERVACIONES
2	Algunos eritrocitos conservan su núcleo y forma. Se observan núcleos sueltos. Los leucocitos conservan su forma.
1	Perdida de citoplasma en algunos eritrocitos, y en otros el citoplasma esta hinchado. Núcleos redondos. Leucocitos diferenciados, aun que comienza a hincharse.
0.5	Solo se observan núcleos de distintos tamaños y color, están libres.
0.25	Núcleos libres y dispersos, eritrocitos completos pero redondeados.
0.125	Núcleos libres y dispersos, eritrocitos completos pero redondeados.

Figura N° 2. Imagen del sedimento de la sangre tratada con NaCl al 1%.



- Eritrocitos hinchados
- Núcleos sueltos
- Citoplasma en forma de vidrio esmerilado
- Leucocito que comienza a hincharse

Método microbiológico

Selección de las cepas bacterianas

Los resultados de la prueba de GRAM y prueba de hemolisis en agar sangre de carnero, así como de la caracterización bioquímica de las cepas bacterianas, se observan el cuadro N° 7 y N°8 respectivamente, se encontró que se trata de los siguientes géneros:

RCC 1, 7, 8, 9 *Bacillus cereus*

RCC 2, 3 *Actinobacillus sp*

RCC 4 *Acinetobacter sp*

RCC 5, 6 *Micrococcus spp*

Además se le midieron los halos de hemolisis obteniendo los resultados indicados en el cuadro N°9. Se aprecian la medida en milímetros de los halos de hemólisis, siendo las cepas de *Bacillus cereus* las que presentan los halos de mayor tamaño.

Cuadro N° 7. Identificación de cepas bacterianas por medio de la prueba de GRAM y prueba de hemólisis.

Cepa	GRAM	Hemólisis en agar sangre de carnero
RCC1	Bacilo G (+)	α
RCC2	Cocobacilo G (-)	(-)
RCC3	Cocobacilo G (-)	β
RCC4	Cocobacilo G (-)	(-)
RCC5	Coco G (+)	β
RCC6	Coco G (+)	β
RCC7	Bacilo G (+)	α
RCC8	Bacilo G (+)	α
RCC9	Bacilo G (+)	α

Se obtuvieron 4 bacilos gram (+), 2 cocos gram (+), 3 cocobacilos gram (-).

Cuadro N°8. Identificación de cepas bacterianas por medio de prueba bioquímicas.

	Cat/Oxi	O/F	MIO	MR/VP	LI A	Sorbitol	Citrato	Urea	TSI	Leche T
Bacilos G(+)										
RCC1	+/+	-/+	-/-/+	+/-	+	-	-	-	Alc/sc	s/c
RCC7	+/+	+/+	+/-/+	+/-	+	-	-	-	Ac/Ac	Coagulo
RCC8	+/+	+/+	+/-/+	+/-	+	-	-	-	Ac/Ac	Coagulo
RCC9	+/+	+/+	+/-/+	+/-	+	+	-	-	Alc/Ac	Coagulo
Cocos G(+)										
RCC5	+/-	+/+	+/-/-	-/-	+	-	-	-	Ac/sc	Fer/lac/C
RCC6	+/-	+/+	+/-/-	-/-	+	-	-	-	Ac/sc	Fer/lac/C
Cocobacilos G(-)										
RCC2	+/+	-/+	-/-/-	-/-	-	-	-	-	Alc/sc	s/c
RCC3	+/+	+/+	-/-/-	-/-	-	-	-	-	Alc/sc	s/c
RCC4	+/-	-/-	-/-/-	-/-	-	-	+	-	Alc/sc	s/c

Cuadro N°9. Halos de hemólisis mostrados por las cepas en estudio sobre agar sangre de ave

Cepa	Identificación	Medida (mm)
RCC1	<i>Bacillus cereus</i>	9
RCC7	<i>Bacillus cereus</i>	30
RCC8	<i>Bacillus cereus</i>	22
RCC9	<i>Bacillus cereus</i>	25
RCC2	<i>Actinobacillus sp</i>	3
RCC3	<i>Actinobacillus sp</i>	5
RCC4	<i>Acinetobacter sp</i>	2
RCC5	<i>Micrococcus spp</i>	2
RCC6	<i>Micrococcus spp</i>	3

Evaluación de producción de hemolisinas

Para realizar la valoración de la producción de hemolisina se realizó la medición de proteínas por el método de Biuret²², los resultados se observan en el cuadro N°10, mismos que son graficados en la figura N°3. En este encontramos que el sobrenadante de la cepa RCC5 de *Micrococcus spp*, tuvo el valor más alto de contenido de proteína con 116mg/ml, seguido de la cepa RCC2 de *Actinobacillus sp* con 93mg/ml.

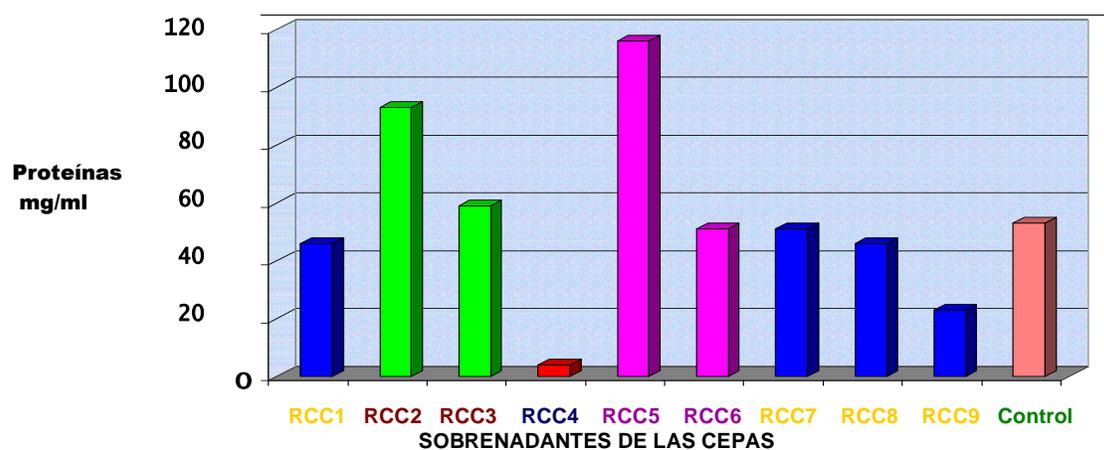
El resultado de la medición del efecto de lisis obtenida a partir de las diluciones de los sobrenadantes se observan en el cuadro N°11. En este podemos ver que en la cepa RCC1, se obtuvo una hemólisis total, del 100%, en la reacción directa y en la dilución 1:2 desde la primera hora, en tanto que en las diluciones posteriores no se presentó hemólisis.

Mientras que en la medición del efecto de lisis obtenida a partir de las diluciones del sobrenadante de la cepa RCC2, a los 30 minutos no tuvo ningún efecto, a partir de la primera hora se reportó una hemólisis parcial es decir del 50%, en la reacción directa y en la dilución 1:2, en las diluciones posteriores no se reportó hemólisis. Las diluciones de las cepas RCC3, RCC4, RCC5 y RCC6 no presentaron hemólisis a ningún tiempo.

CUADRO N° 10 Medición de proteínas en el sobrenadante de un cultivo sobre caldo soya tripticaseína por el método de Biuret.

Sobrenadante de la cepa	Identificación	Concentración de proteínas (mg/ml)
RCC1	<i>Bacillus cereus</i>	46.0
RCC7	<i>Bacillus cereus</i>	51.0
RCC8	<i>Bacillus cereus</i>	46.0
RCC9	<i>Bacillus cereus</i>	23.0
RCC2	<i>Actinobacillus sp</i>	93.0
RCC3	<i>Actinobacillus sp</i>	59.9
RCC4	<i>Acinetobacter sp</i>	4.0
RCC5	<i>Micrococcus spp</i>	116.0
RCC6	<i>Micrococcus spp</i>	51.0
RCC10 (control)	Caldo Soya Tripticaseína (CST)	53.0

Figura N° 3. Cantidad de proteínas contenidas en el sobrenadante de un cultivo sobre caldo soya tripticaseína obtenidas por el método de Biuret.



CUADRO N° 11 Efecto de lisis selectiva de diversas concentraciones de hemolisinas

Cepa	Dilución (máximo efecto)	TITULO UH	Tiempo h (mínimo efecto)	Proteínas (mg/ml)	Actividad especifica (UH/mg)
RCC1	1:2 total	2	1	46	0.290
RCC2	1:2 parcial	1	1	93	0.072
RCC3	(-)	0	(-)	59.9	0.000
RCC4	(-)	0	(-)	4	0.000
RCC5	(-)	0	(-)	116	0.000
RCC6	(-)	0	(-)	51	0.000
RCC7	1:2 total	2	1	51	0.260
RCC8	1:2 total	2	1	46	0.290
RCC9	1:2 parcial	1	1	23	0.290

UH= inverso de la dilución máxima que produce efecto

En la medición del efecto de lisis obtenida a partir de las diluciones del sobrenadante de la cepa RCC7 y RCC8 observadas en el cuadro N°12, se apreció para la cepa RCC7, hemólisis total, del 100%, desde la primera hora en todas las diluciones. Para las diluciones del sobrenadante de la cepa RCC8 se obtuvo hemólisis del 100% desde la primera hora en la reacción directa y en la dilución 1:2, y para las diluciones 1:4, 1:8 y 1:16, en la primer hora se obtuvo hemólisis al 50% y para la segunda hora se vio modificado el efecto, hasta llegar a un 100% de hemólisis, excepto para la dilución 1:16 que mantuvo una hemólisis parcial.

En la medición del efecto de lisis obtenida a partir de las diluciones del sobrenadante de la cepa RCC9, se obtuvo hemólisis parcial en la reacción directa y en la dilución 1:2, a partir de la primer hora. En las diluciones posteriores no se reportó hemólisis.

Cuadro N°12. Medición del efecto de lisis obtenida a partir de las diluciones del sobrenadante de las cepas RCC7 y RCC8.

Tiempo h	Diluciones del sobrenadante de la cepa RCC7				
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
0.5	0	0	0	0	0
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100
	Diluciones del sobrenadante de la cepa RCC8				
0.5	0	0	0	0	0
1	100	100	50	50	50
2	100	100	100	100	50
3	100	100	100	100	50
4	100	100	100	100	50
5	100	100	100	100	50

100 = hemólisis total

50= hemólisis parcial

0 = No hemólisis

De las diluciones en las cual hubo hemólisis total a la primera hora, se realizaron frotis y esto fue lo que se observo.

RCC1

En la reacción directa se observo que el 100% de los eritrocitos perdieron su forma, de estos un 10% comenzaron a perder su membrana. No se observan los leucocitos. En la superficie del frotis se observaron pocas células. En la dilución 1:2 se observo que el 100% de los eritrocitos perdieron su forma, de estos un 10% comenzó a perder su membrana, se observan núcleos libres. No se observan los leucocitos (figura 4). Se observan mayor cantidad de células que en la dilución anterior.

RCC2

En la reacción directa se observó que el 99% eritrocitos estaban completos, estos conservan su forma, poca cantidad perdió su citoplasma. El 1% de los leucocitos están bien definidos. En la dilución 1:2 se observó en un 99% eritrocitos completos, el 1% son núcleos libres. Hay poca cantidad de leucocitos, se observaron bien definidos.

RCC6

En la reacción directa se observaron 90% de los eritrocitos completos y el 10% fueron núcleos sueltos. En la dilución 1:2 se observaron eritrocitos completos en un 60% y el resto fueron destruidos.

RCC7

En la reacción directa se observaron eritrocitos completos en un 80%, muy dispersos, el citoplasma comenzaba a romperse, sus núcleos aumentados de tamaño en un 50%. Un 5% de eritrocitos redondos y completos.

En la dilución 1:2 no se observaron eritrocitos, se apreciaron solo leucocitos bien definidos, en especial los heterófilos con buena morfología (figura 5), aunque comenzaban a corrugarse, su citoplasma se observó un poco esmerilado (figura 6).

En la dilución 1:4 se apreció 50% de eritrocitos completos y el otro 50% comienzan a perder su forma, el citoplasma comenzaba a romperse. En la dilución 1:8 el 80% de los GR estaban completos. Los leucocitos se observaban bien definidos. Para la dilución 1:16 el 60% de los eritrocitos estaban completos y en un 40% comenzaban a hincharse y perder su forma. Los leucocitos no se observan. En las diluciones 1:256 y 1:512 se observaron eritrocitos completos y el frotis se veía muy grumoso en ambas diluciones.

RCC8

El 100% de los eritrocitos estaban completos, comenzaron a perder su forma. Frotis muy grumoso en la reacción directa. En la dilución 1:2 los eritrocitos completos, el 40% conservó su forma, 40% núcleos libres, 20% eritrocitos hinchados (figura 7), y el 5% son leucocitos de color morado (figura 8).

RCC9

En la reacción directa se observaron el 20% de los eritrocitos completos, leucocitos se observan redondos y morados. En la dilución 1:2 Todos los eritrocitos están completos y comienzan a hincharse y los leucocitos se observan redondos y morados (figura 9).

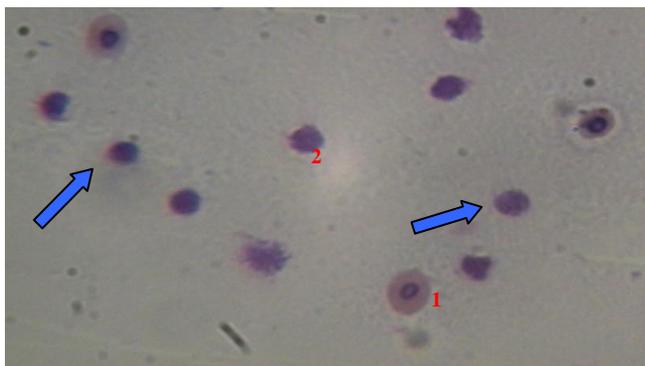
Se utilizaron dos controles uno negativo que fue solución salina fisiológica (SSF) y un control positivo que fue el agua destilada. Los resultados obtenidos en la observación del frotis fueron los siguientes:

SSF (-): se observaron eritrocitos muy amontonados y completos en un 100%

Agua destilada (+):70% GR completos y 30% de estos se encuentran con el citoplasma destruido

Imágenes de los frotis realizados y teñidos con Wright

Figura N° 4. Imagen del sedimento de la sangre tratada con la dilución 1:2 de la cepa RCC1 en la primer hora.

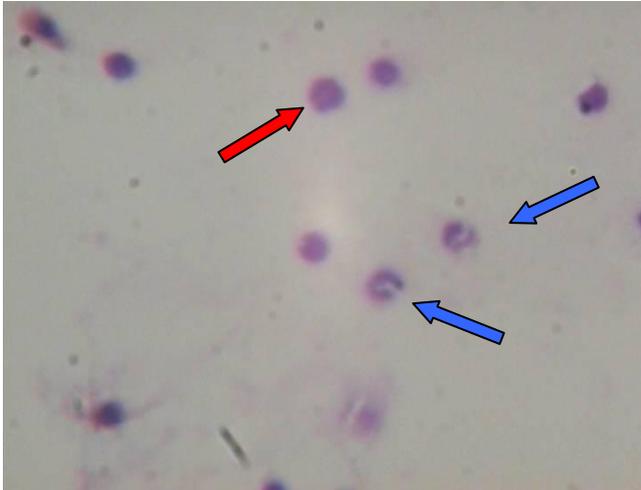


1 Eritrocitos perdieron su forma

2 Eritrocitos con pérdida de membrana

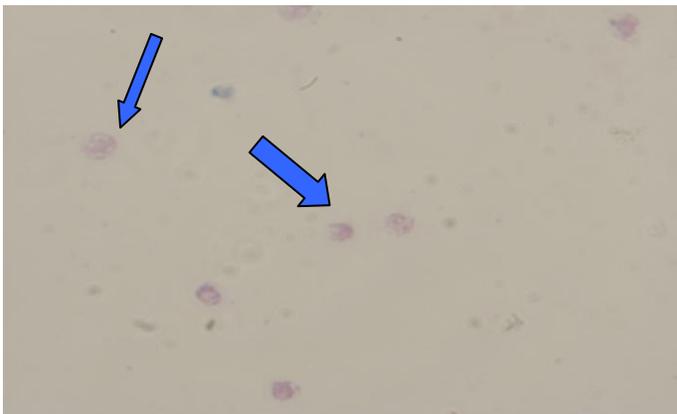
➡ Núcleos libres.

Figura N° 5. Imagen del sedimento de la sangre tratada con la dilución 1:2 de la cepa RCC7 en la primer hora.



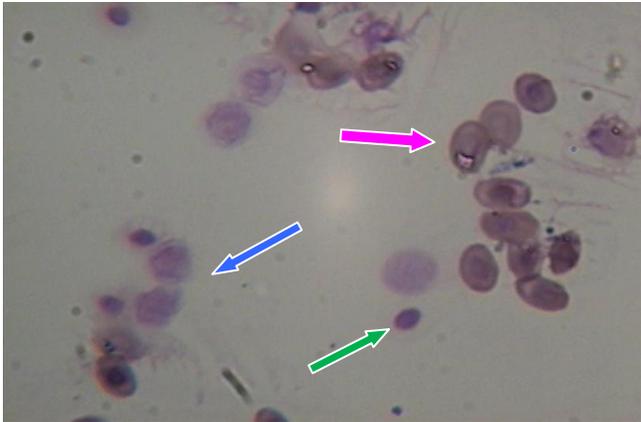
-  Heterófilos
-  Leucocitos

Figura N° 6. Imagen del sedimento de la sangre tratada con la dilución 1:2 de la cepa RCC7 en la primer hora.



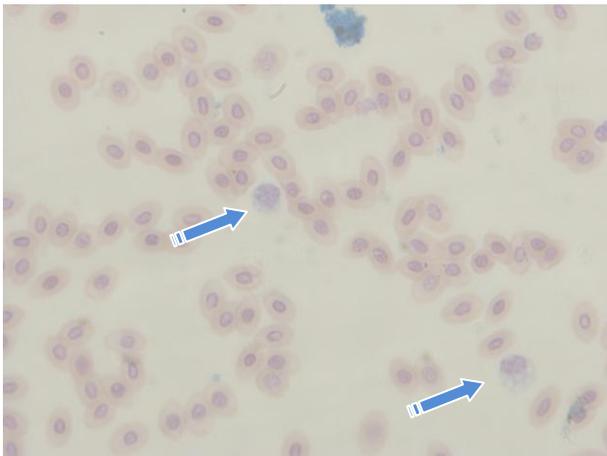
-  Heterófilos

Figura N° 7. Imagen del sedimento de la sangre tratada con la dilución 1:2 de la cepa RCC8 en la primer hora.



-  Eritrocito completo
-  Leucocitos
-  Núcleo del eritrocito

Figura N° 8. Imagen del sedimento de la sangre tratada con la dilución 1:2 de la cepa RCC8 en la primer hora.



-  Linfocitos

Figura N° 9. Imagen del sedimento de la sangre tratada con la dilución 1:2 de la cepa RCC9 en la primer hora.



→ Eritrocitos completos

DISCUSIÓN

Método químico

El recuento de los leucocitos es uno de los métodos de rutina. La condición previa al recuento es la dilución de la muestra. El ácido acético contenido en la solución de Turk hemolisa los eritrocitos y el colorante contenido tiñe a los leucocitos. Se recuenta el tipo de células deseado en un volumen definido y se calcula el número de células en un microlitro de sangre.¹⁵

El reactivo de turk es utilizado en la biometría hemática para mamíferos, en la técnica manual del conteo de leucocitos. Este reactivo contiene ácido acético, esta sustancia se utilizo a diferentes diluciones para tratar de encontrar un punto de lisis selectiva de eritrocitos de sangre de ave, esta muestra de sangre representaba un reto por la presencia del núcleo en los eritrocitos, al término de las pruebas se encontró que hubo una lisis parcial de eritrocitos, ya que en solo un porcentaje de estos causo efecto de lisis, es importante mencionar que en las diluciones del 16%, 8%,4%, 1.6%, 0.8%, 0.4% y 0.01%, el ácido acético provoco en los eritrocitos una alteración del núcleo, ya que este no se observa , afectando solo en su forma al citoplasma. Encontramos en este método a los leucocitos presentes aunque redondeados en su totalidad, lo que nos indicaría que la solución comenzaba a afectarlos. Se observa de manera importante la destrucción de los eritrocitos en todas las diluciones, más no su lisis total, de igual forma afecta en menor proporción a los leucocitos, los cuales pierden su morfología normal.

El NaCl se ocupa en la prueba de fragilidad osmótica eritrocítica, la cual se basa en someter a los eritrocitos a una solución de NaCl en diferentes concentraciones para medir su grado de hemólisis.²⁶

En esta investigación el NaCl se utilizo para tratar de lisar a los eritrocitos de ave, se apreciaron eritrocitos que conservan su forma y algunos núcleos sueltos, otros mas perdieron su forma. Se observaron variaciones en las cantidades de Hb obtenidos a distintas diluciones del NaCl, pudiéndose observar cantidades desde 7.74g/dl hasta 37.31g/dl.

Nemi y Jain (1986) dicen que la concentración de hemoglobina en sangre de ave tiene un rango de 7.0 a 13.0g/dl.²⁶

Al realizar la lectura de hemoglobina a las distintas concentraciones de NaCl al 2%, 1% y 0.125%, a las cuales se les agrego 0.1 ml de sangre de ave, podemos mencionar que estas diluciones no son las que se desean para alcanzar el grado de lisis total de los eritrocitos, ya que la hemoglobina liberada se encuentra en rango. Para el caso de las concentraciones de 0.5% y 0.25% con una liberación de hemoglobina del 37.31g/dl y 27.69 g/dl, respectivamente, se observo una salida de hemoglobina mayor a la que se encontraría dentro del rango, lo que nos hace creer que la lisis de los eritrocitos alcanzo su máximo efecto. Una vez llevadas estas diluciones al frotis y teñidas, se observo que ninguna de las diluciones es la adecuada para llevar acabo la lisis total requerida, ya que en estas se observan eritrocitos completos, así como sus núcleos sueltos.

Parpart y col. (1947) recomiendan una preparación de buffer de una solución de NaCl al 10%, la cual diluyen con agua destilada hasta alcanzar 50ml, de la cual queda una solución al 1% de NaCl.²⁶En esta investigación se encontró que a la dilución de NaCl al 1% había perdida del citoplasma de las eritrocitos en un 20% y en el resto el citoplasma comienza a hincharse, los núcleos se observan redondeados. A pesar de que esta dilución no fue la adecuada para la lisis total de eritrocitos se concuerda con el investigador al recomendar esta dilución para la prueba de fragilidad osmótica eritrocítica ya que se obtuvo una cantidad de Hb que se encuentra dentro del rango de los valores manejados en las aves.

Método microbiológico.

Se aislaron 9 cepas de bacterias que causaron una actividad importante de hemólisis en agar sangre de ave, de los cuales se encontraron 4 tipos distintos de bacterias, de estas una es capaz de hacer el efecto de lisis selectiva a eritrocitos, al ser mezclado el sobrenadante que contiene la hemolisina de esta bacteria con la sangre de ave . Esta cepa corresponde a *Bacillus cereus*.

Se encontraron 4 cepas de *Bacillus cereus*, las cuales al realizar la medición de proteínas se encontró variación entre ellas: la cepa RCC9 tuvo 23mg/dl, las cepas RCC1 y

RCC8 coinciden con 46mg/ml y la que más cantidad de proteína reportó fue la cepa RCC7 con 51mg/dl.

Podemos observar que la cepa RCC7 de *B. cereus*, obtuvo la mayor cantidad de proteína y esta fue la que tuvo el efecto de lisis deseado, aunque en comparación con las cepas RCC2 y RCC5, su contenido de proteína es menor y se esperaría que estas cepas hubieran producido un mejor efecto de lisis selectiva de eritrocitos.

El contenido de proteínas está relacionado con la capacidad de hemólisis, las hemolisinas de *B. cereus* con relación a las otras cepas, tiene un contenido medio de éstas. Se podría pensar que a más proteína mayor efecto de lisis, aunque no es así. Lo que nos habla la especificidad de esta hemolisina de *Bacillus cereus*.

La producción de hemolisinas por las bacterias se ha ligado a la virulencia. Aunque para algunas especies esto pueda ser cierto, no lo es para otras puesto que microorganismos totalmente apatógenos también producen hemolisinas. Una sola especie bacteriana puede producir más de una hemolisina.⁹

Pudimos encontrar que al ser una bacteria patógena oportunista y aislada del ambiente, *B. cereus* produce la hemolisina o hemolisinas capaces de producir el efecto esperado, sin dañar a los leucocitos.

Las hemolisinas lisan los eritrocitos. Las reacciones hemolíticas y modos de acción de las diversas hemolisinas varían netamente. La susceptibilidad de los eritrocitos está relacionada directamente con la cantidad de hemolisina.⁶

Se encontró también que a pesar de tratarse de 4 cepas del mismo bacilo, cada una produce distintas cantidades de proteína, por esta razón encontramos que aunque se trate del mismo *Bacillus*, no produce el mismo efecto de lisis en todas las diluciones y en todos los tiempos.

Miles 2002. *B. cereus* produce dos distintas proteínas hemolíticas, la hemolisina II y la citotoxina K.²⁷ Se han propuesto tres enterotoxinas, la hemolisina BL (Hbl), la citotoxina K y enterotoxina no hemolítica (Nhe). Hbl y Nhe son citotoxinas de tres componentes y la Nhe tiene una mayor citotoxicidad.²⁸ Por esta razón podemos decir que al tener cepas de la misma especie de *Bacillus cereus*, no todas lograron el efecto de lisis requerido.

Es así como, a pesar de tener un contenido proteico mayor en el caso de la hemolisina de *Micrococcus spp.* Este no lisa a los eritrocitos y los deja intactos en un 90% del total del

frotis en las distintas diluciones, pues la acción de la hemolisina no depende de la cantidad de proteína.

En la dilución 1:2 de la hemolisina de *B. cereus*, se encontró el efecto deseado, exclusivamente en los frotis realizados y leídos a los 60 minutos, en estas se observaron los leucocitos bien definidos, aunque comenzaban a modificar en forma casi indetectable de su citoplasma. Se trató de acortar el tiempo haciendo una dilución con una lectura a los 30 minutos, pero en estos frotis encontramos eritrocitos intactos.

De acuerdo con la investigación acerca de la hemolisina E de *Escherichia coli*, Yadav y col. 2008 Una unidad hemolítica fue definida como la cantidad de péptido, que causó a 50% la lisis de los eritrocitos después de una incubación a 37°C por 2 horas.¹⁰

En esta investigación una unidad hemolítica es representada de igual manera como la cantidad de hemolisina que causa lisis en un 50% del total de los eritrocitos expuestos al sobrenadante de *B. cereus*. En esta investigación se nombro como hemolisis parcial para representar el 50% y hemolisis total para representar el 100%.

De las cuatro cepas de *Bacillus cereus*, tres causaron hemólisis total, representada por 2UH, pero solo una de ellas permitió la observación de los leucocitos sin presentar alteraciones morfológicas detectables.

De acuerdo con Miles 2002, *B. cereus* es un patógeno oportunista y se encuentra en el medio ambiente.²⁷ Esta cepa bacteriana fue aislada de heces de ave de corral. Lo cual hizo posible su recolección y aislamiento para este estudio.

La hematología es un componente esencial de la práctica veterinaria. La interpretación de glóbulos aviares proporciona muchos desafíos. Los médicos deben poder reconocer morfología normal y la función de células para interpretar cambios en esas células. Los métodos manuales de contar eritrocitos aviares se describen bien, sin embargo, no se ejecutan a menudo en la práctica, dado a la falta de instrumentación automatizada apropiada para el uso en hematología aviar.²⁹

En comparación con los métodos manuales utilizados, en los cuales se dificulta la diferenciación de los distintos tipos celulares, a la revisión de estos frotis si se puede apreciar cada una de estas células y se puede realizar un conteo más preciso para dar un mejor resultado.

CONCLUSIÓN

Al emplearse ácido acético y NaCl en diferentes diluciones a la sangre de ave, no se presentó la actividad de lisis selectiva deseada a los eritrocitos. Estos métodos no pudieron ser utilizados como una técnica de eliminación de eritrocitos.

Mas sin embargo, al obtenerse a partir del método biológico, la hemolisina de cada una de las 9 cepas aisladas en agar sangre de ave, se encontró una técnica diferente de lisis de eritrocitos que permite el conteo de leucocitos.

De las 9 cepas hemolíticas utilizadas se obtuvieron 4 diferentes especies. De las cuales una de ellas causa el efecto de lisis deseado, esta sustancia capaz de lograrlo corresponde a la hemolisina de la cepa de *Bacillus cereus*.

Esta investigación logro obtener un método distinto para la cuantificación de leucocitos de aves, a partir de la hemolisina obtenida de *Bacillus cereus*. Aunque es necesario precisar el tiempo adecuado en el cual hay lisis en su totalidad de los eritrocitos y que los leucocitos no pierdan su forma original, y así mismo, se requerirá reducir el tiempo en el cual esta hemolisina actué sobre los eritrocitos, para que este sea en el menor tiempo posible y así tener una técnica efectiva, rápida y veraz para el conteo total de leucocitos.

Se necesitara de posteriores pruebas para comprobar su eficacia ya como un método específico para realizar la biometría hemática en forma automatizada, además que representaría un nuevo método para un conteo manual, ya que su aplicación es de manera practica y sencilla para el realizador.

BIBLIOGRAFÍA

1. Voigt GL. Conceptos y técnicas hematológicas para técnicos veterinarios. 1ª ed. España: Editorial Acribia, S.A, 2003.
2. Reagan WJ, Sanders T.G, DeNicola DB. Hematología Veterinaria. Atlas de especies domesticas comunes. 1ª ed. USA: Ediciones S, 2000.
3. Kelly WR. Diagnóstico Clínico Veterinario. 1ª ed. México: Editorial Continental S.A, 1981.
4. Rebar AH, MacWilliams PS, Feldman BF, Metzger FL, Pollock RVH, Roche J. Manual de Hematología de Perros y Gatos. 1ª ed. España: Multimedica S.A, 2002.
5. Coffin DL. Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria. 3ª ed. México: Ediciones Científicas la Prensa Medica Mexicana, 1981.
6. Scalan CM. Introducción a la Bacteriología Veterinaria. 1ª ed. España: Editorial Acribia, 1991.
7. Merchant IA, Packer RA. Bacteriología y Virologia Veterinarias. 3ª ed. España: Editorial Acribia, 1980
8. Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud JM, Héchard Y. d-Hemolysin, an Update on a Membrane-interacting Peptide. France : Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau. Universite´ de Poitiers. 2008.
9. Toraño PGT, Vilaseca MJC, Martinez IT, Pérez C. Producción y purificación parcial de la hemolisina principal (Neumolisina) de *Streptococcus pneumoniae*. Rev. Cubana Med. Trop. Cuba: Instituto de Medicina Tropical, 1999.
10. Yadav SP, Ahmad A, Pandey BK, Singh D, Asthana N, Verma R, Tripathi RK, Ghosh JK. A peptide derived from the putative transmembrane domain in the tail region of E. coli toxin hemolysin E assembles in phospholipid membrane and exhibits lytic activity to human red blood cells: Plausible implications in the toxic activity of the protein. INDIA: Molecular and Structural Biology Division, Central Drug Research Institute. 2008.

11. Pineda MY, Rodríguez LV. Producción de colicinas, hemolisinas y resistencia a los antimicrobianos en cepas de *escherichia coli* de cerdos con diarrea. Venezuela: Veterinaria tropical, 1990.
12. Shimuta k, Ohnishi M, Iyoda S, Gotoh N, Koizumi N, Watanabe H. The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on lysophospholipid production by PhlA. Japan: Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases. 2009
13. Campbell TW, Ellis CK. Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology, 3^aed. USA: Blackwell Publishing Professional, 2007.
14. Samour J. Avian Medicine, 1^a ed. Tokio: Harcourt Publishers Limited, 2000.
15. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Veterinary Hematology, 5^a ed. Canada: Ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2000.
16. Beynon PH, Forbes NA, Martin PCL. Manual of Psittacine Birds, 1^a ed. USA: British Small Animal Veterinary Association, 1996.
17. Rupley AE. Veterinary clinics of North America. Exotic Animal Practice. Avian Pet Medicine, 1^a ed. USA: The Clinics Collection, 2005.
18. Chitty J. Manual of Psittacine Bird, 2^aed. India: Hancourt- Brown, 2005.
19. Tully TN, Lawton MPC, Dorrestein GM. Avian Medicine, 1^a ed. USA: Butterwoeth Heinemann, 2000.
20. Coles BH. Avian Medicine and Surgery, 2^aed. USA: Blackwell Science, 1997.
21. Fudge AM. Laboratory Medicine. Avian and Exotic Pets, 1^a ed. USA: W.B. Saunders Company, 2000.
22. Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR. Avian Medicine: Principles and Aplication, 1^a ed. USA: HBD International, Inc, 1999.

23. Fowler ME, Cubas ZS. *Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*, 1^a ed. USA: Library of Congress Cataloging in-Publication Data, 2001.
24. Mac Faddin JF. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, 1^a ed. México: Editorial Medica Panamericana, 1990.
25. Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW. *Clinical Pathology*, 4^a ed. USA: Iowa state press, 2003.
26. Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*, 4^a ed. USA: Lea – Febiger, 1986.
27. Miles G, Bayley H, Cheley S. Properties of *Bacillus cereus* hemolysin II: A heptameric transmembrane pore. USA: Department of Medical Biochemistry and Genetics. 2002.
28. Fagerlund A, Lindbäck T, Storset AK, Granum EP, Ardi SP. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. Norway: Department of Food Safety and Infection Biology, Norwegian School of Veterinary Science. 2007
29. Mitchell EB, Johns J. *Avian Hematology and Related Disorders*. USA: Clinical Pathology a Companion Avian and Exotic Pet Medicine, Veterinary Medical Teaching Hospital, University of California. 2008.