
DIAGNÓSTICO VETERINARIO

**REQUISITOS, PROCESO,
INTERPRETACIÓN, VENTAJAS Y
DESVENTAJAS DE TÉCNICAS
DIAGNÓSTICAS**

G. VALERO

TERCERA EDICIÓN

Diagnóstico Veterinario

TERCERA EDICIÓN

Germán Valero Elizondo, MVZ, MPhil, MC,
Investigador Titular C, Laboratorio de Diagnóstico,
Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en
Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales y Agropecuarias (S.A.G.A.R.).
Profesor del Posgrado en Patología Veterinaria, Facultad
de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad
Nacional Autónoma de México.
Socio Fundador de la Sociedad Mexicana de Patólogos
Veterinarios, A.C.
Socio Numerario de la Academia Veterinaria Mexicana,
A.C.

NOTAS

Los autores y editores han hecho lo posible para evitar errores e inexactitudes en el texto, pero no asumen responsabilidades legales por problemas resultantes de la aplicación de las técnicas aquí descritas.

La inclusión de nombres o marcas comerciales es con meros fines de ilustración de un aspecto importante, y no significa una publicidad o preferencia de los autores hacia una marca particular.

La información contenida en cada capítulo es responsabilidad exclusiva de los autores de dicho capítulo, y no necesariamente representa el punto de vista de sus instituciones o de la S.M.P.V.

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra,
por cualquier medio, sin autorización escrita del editor.

DERECHOS RESERVADOS © MM, para esta tercera edición, por

Germán Valero Elizondo y 20 coautores más.

Toda correspondencia debe dirigirse a: Germán Valero Elizondo,
Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C.

Departamento de patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; Ciudad
Universitaria, México, D.F. 04510.

Primera edición, 1993

Tercera edición, 2000

Impreso en México - Printed in México

Autores

Francisco Aguilar Romero, MVZ, Maestro en Ciencias,
Investigador Titular C, Proyecto Neumonías, CENID-Microbiología, INIFAP, SAGAR

Beatriz Arellano Reynoso, MVZ, Maestra en Ciencias,
Investigador Asociado C, Proyecto Tuberculosis Bovina, CENID-Microbiología, INIFAP,
SAGAR

Nuria de Buen de Argüero, MVZ,
Profesor Titular C, Departamento de Patología, Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
U.N.A.M.
Ex-presidente y Socio Fundador de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C.
Socio Numerario de la Academia Veterinaria Mexicana, A.C.

Irma Eugenia Candanosa Aranda, MVZ, Maestra en Ciencias
Profesor Asociado C, Departamento de Patología Clínica, Facultad de Medicina Veterinaria
y Zootecnia, U.N.A.M.
Socio Titular de la S.M.P.V.

Efrén Díaz Aparicio, MVZ, Maestro en Ciencias, Doctor en Ciencias,
Investigador Titular C, Proyecto de Brucelosis Caprina, CENID-Microbiología, INIFAP,
SAGAR
Socio Numerario de la Academia Veterinaria Mexicana, A.C.

Moisés Fraire Cachón, MVZ,
Jefe del laboratorio de diagnóstico, Comisión México-Estados Unidos para la prevención de
la fiebre aftosa y otras enfermedades del ganado (CPA), Dirección General de Sanidad
Animal, SAGAR

Dolores G. Gavaldón Rosas, MC,
Profesor Titular B, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco.

Juan García García, MVZ, PhD,
Investigador Titular C, Proyecto de Influenza Aviar, CENID-Microbiología, INIFAP,
SAGAR

Sofía González Gallardo, MVZ, Maestra en Ciencias,
Profesor Titular B, Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán, U.N.A.M

Dante González Salazar, MVZ, Maestro en Ciencias,
Investigador Titular C, Laboratorio de Diagnóstico, CENID-Microbiología, INIFAP,
SAGAR
Socio Titular de la S.M.P.V.

Laura Hernández Andrade, Q, Maestra en Ciencias,
Investigador Titular B, Laboratorio de Bacteriología, CENID-Microbiología, INIFAP,
SAGAR

Eliseo Hernández Baumgarten, MVZ, MSc, PhD,
Profesor Titular C, Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán, U.N.A.M.
Socio Numerario de la Academia Veterinaria Mexicana, A.C.

Luis Felipe Jiménez García, Doctor en Ciencias,
Profesor Titular A, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M..

Alfonso López Mayagoitia, MVZ, MSc, PhD,
Profesor de Patología, Colegio Veterinario del Atlántico, Universidad de la Isla del Príncipe
Eduardo, Canadá.
Socio Titular de la S.M.P.V.
Socio Numerario de la Academia Veterinaria Mexicana, A.C.

Arturo Mancera Martínez, MVZ, Maestro en Ciencias,
Investigador Titular C, Laboratorio de Bacteriología, CENID-Microbiología, INIFAP,
SAGAR

René Neftalí Márquez Márquez, QBP, Maestro en Ciencias, Doctor en Ciencias
Investigador Titular C, Laboratorio de Micotoxinas, CENID-Microbiología, INIFAP,
SAGAR

Luis Pedro Moles y Cervantes, MVZ,
Investigador Titular C, Laboratorio de Leptospirosis, CENID-Microbiología, INIFAP,
SAGAR
Profesor Investigador de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco

Juan I. Monroy Basilio, MVZ, Maestro en Ciencias,
Investigador Titular C, Laboratorio de Diagnóstico, CENID-Microbiología, INIFAP,
SAGAR
Socio Titular de la S.M.P.V.

J. Francisco Morales Alvarez, MVZ, Maestro en Producción Animal,
Investigador Titular C, Laboratorio de Bacteriología, CENID-Microbiología, INIFAP,
SAGAR
Socio Titular de la S.M.P.V.

Ma. De Lourdes Ontiveros Corpus, QFB, Maestra en Ciencias,
Investigador Titular C, Laboratorio de Bacteriología, CENID-Microbiología, INIFAP,
SAGAR

Julia Pérez Ramos, Maestra en Ciencias,
Profesor Investigador Titular C, Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco.

I. Carolina Ramírez Casillas, MVZ, Maestra en Producción Animal,
Investigador Titular C, Proyecto de Tuberculosis Bovina, CENID- Microbiología, INIFAP,
SAGAR

Humberto Ramírez Mendoza, MVZ, Maestro en Ciencias, Doctor en Ciencias
Técnico Académico Titular B, Departamento de Producción Animal: Cerdos, Facultad de
Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M.

René Rosiles Martínez, MVZ, MSc,

Profesor Titular C, Laboratorio de Toxicología, Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M.

Lourdes Segura Valdés, Biol, Maestra en Ciencias, Doctor en Ciencias

Investigador Asociado C, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, S.S.A.

Víctor R. Tenorio Gutiérrez, QFB, Maestro en Ciencias, Doctor en Ciencias

Investigador Titular C, Laboratorio de Bacteriología, CENID-Microbiología, INIFAP, SAGAR

Jorge L. Tórtora Pérez, MV, Maestro en Ciencias, Doctor en Ciencias,

Profesor Titular C, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M.

Socio Numerario de la Academia Veterinaria Mexicana, A.C.

Germán Valero Elizondo, MVZ, M. Phil, Maestro en Ciencias,

Investigador Titular C, Lab. de Diagnóstico, CENID-Microbiología, INIFAP, SAGAR

Presidente y Socio Fundador de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C.

Socio Numerario de la Academia Veterinaria Mexicana, A.C.

Guillermo Valero Elizondo, MC, Esp. A. Patol,

Patólogo, Departamento de Anatomía Patológica, Hospital de Cardiología, Centro Médico

Nacional Siglo XXI, I.M.S.S.

Beatriz Vanda Cantón, MVZ, Esp. Patología Veterinaria, Maestra en Ciencias,

Investigador Asociado C, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, S.S.A..

Socio Titular de la S.M.P.V.

Jesús Vázquez Navarrete, MVZ, Maestro en Ciencias,

Investigador Titular B, Laboratorio de Bacteriología, CENID-Microbiología, INIFAP,

SAGAR

Francisco Velázquez Quezada, Q.

Investigador Titular C, Laboratorio de Bacteriología, CENID-Microbiología, INIFAP,

SAGAR

Comité Editorial

Germán Valero Elizondo, MVZ, MPhil, Maestro en Ciencias,
Investigador Titular C, CENID-Microbiología, INIFAP, SAGAR
Presidente y Socio Fundador de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C.
Socio Numerario de la Academia Veterinaria Mexicana, A.C.

Beatriz Vanda Cantón, MVZ, Esp. Patología Veterinaria, Maestra en Ciencias,
Investigador Asociado C, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, SSA
Socio Titular de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C.

Raúl Flores-Crespo, Biol,
Investigador Titular C, CENID-Parasitología, INIFAP, SAGAR
Editor General de la revista Técnica Pecuaria en México.

Eliseo Hernández Baumgarten, MVZ, MSc, PhD,
Profesor Titular C, Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán, U.N.A.M.
Socio Numerario de la Academia Veterinaria Mexicana, A.C.

Francisco J. Trigo Tavera, MVZ, MSc, PhD,
Profesor Titular C, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M.
Ex-presidente y Socio Fundador de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios,
A.C.
Socio Numerario de la Academia Veterinaria Mexicana, A.C.

Prefacio

La palabra griega *diagnostikos* significa distinguir o conocer.

Si bien existen excelentes textos sobre Patología de los animales domésticos, la parte práctica del diagnóstico en Medicina Veterinaria no está del todo cubierta en obras accesibles al estudiante o profesional en países latinoamericanos. Este libro es una colección de técnicas simples, confiables, de utilidad para quienes requieren obtener diagnósticos en su ejercicio profesional de la medicina veterinaria. Se describen las características que deben reunir las muestras, las indicaciones y contraindicaciones de las técnicas, los materiales y métodos de elección y alternos, la interpretación de resultados, los errores más comunes y como evitarlos. Para aquellas personas interesadas en profundizar en un tema, se incluye una lista de lecturas recomendadas para cada capítulo.

Este libro fue diseñado como una referencia para veterinarios en la práctica profesional y alumnos que cursan Patología General y Sistémica a nivel licenciatura, aunque también se recomienda para alumnos de posgrado, patólogos graduados, técnicos laboratoristas, profesionales en laboratorios de diagnóstico y veterinarios generales o especialistas en las diferentes especies, interesados en las técnicas de diagnóstico veterinario.

El libro está dividido en tres partes: En la primera se describen las técnicas diagnósticas generales: inspección de cadáveres, investigación de abortos, patología clínica, toxicología y preparación de soluciones. En la segunda parte se describen las técnicas que utilizan un microscopio: histopatología, citología, histoquímica, inmunohistoquímicas, biología molecular, diagnóstico de neoplasias y microscopía electrónica. La última parte trata sobre diagnóstico de enfermedades infecciosas: brucelosis, leptospirosis, parasitosis, mastitis, rabia y otras enfermedades virales. Se describen además, toma y envío de muestras de enfermedades virales y bacterianas, desinfección y desinfectantes.

El objetivo de este libro es proporcionar un texto moderno, conciso, en idioma español y con énfasis en la solución de problemas diagnósticos veterinarios en México y Latinoamérica. Los más de treinta autores de los veintitrés capítulos son investigadores y profesionales nacionales o internacionales de reconocida experiencia en su tema. Los editores son especialistas con amplia experiencia docente y editorial.

Los autores reconocen que esta obra es perfectible, y agradecerán las observaciones y sugerencias que, con el fin de mejorar ediciones futuras, se les hagan llegar.

Los Autores
México D.F.

Dedicatoria y agradecimientos

*Todos los animales fueron creados iguales.
... pero algunos son más iguales que otros*

George Orwell

Este libro está dedicado a las familias de los autores y editores, que les tuvieron paciencia y los apoyaron durante el largo tiempo de preparación y revisión de los manuscritos.

*He juntado un ramillete de flores de los jardines de otras personas.
Nada, excepto el lazo que las une, es mío.*

Montaigne

Los editores agradecen la ayuda y comprensión recibidas de los numerosos autores y de sus instituciones, que permitieron la creación exitosa de las tres ediciones de este libro. También deseamos agradecer los comentarios favorables que recibimos de los lectores, que nos motivaron a complementar las primeras ediciones.

*La gente a menudo piensa que yo tengo las respuestas,
cuando a veces ni siquiera tengo las preguntas*

Isaac Asimov

Contenido

<i>Inspección de cadáveres y descripción de lesiones macroscópicas</i>	11
<i>Investigación de abortos y mortalidad perinatal</i>	22
<i>Patología clínica</i>	30
<i>Toxicología diagnóstica elemental</i>	34
<i>Preparación de soluciones</i>	42
<i>Uso del microscopio óptico</i>	51
<i>Histopatología</i>	58
<i>Revisión y descripción de cortes histológicos</i>	69
<i>Citología diagnóstica</i>	73
<i>Histoquímica diagnóstica</i>	76
<i>Inmunohistoquímica elemental</i>	87
<i>Biología molecular</i>	92
<i>Diagnóstico de neoplasias de piel y tejidos blandos</i>	97
<i>Proceso para microscopía electrónica</i>	104
<i>Toma y envío de muestras para diagnóstico de enfermedades bacterianas y micóticas</i>	109
<i>Diagnóstico de mastitis</i>	118
<i>Diagnóstico de brucelosis</i>	125
<i>Diagnóstico de leptospirosis</i>	140
<i>Toma y envío de muestras para diagnóstico de enfermedades virales</i>	145
<i>Diagnóstico de enfermedades virales</i>	153
<i>Diagnóstico de rabia</i>	160
<i>Diagnóstico de parasitosis</i>	170
DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES DE LOS ANIMALES DOMÉSTICOS	175
<i>Desinfección y desinfectantes</i>	211
<i>Índice</i>	219

Inspección de cadáveres y descripción de lesiones macroscópicas

Alfonso López Mayagoitia

Introducción

Eutanasia

Precauciones al hacer una necropsia

Contraindicaciones de necropsia

Historia clínica

La necropsia como instrumento de diagnóstico

Como hacer una necropsia y como interpretar las lesiones macroscópicas

Como se deben describir las lesiones macroscópicas

Técnica de una necropsia

Inspección externa

Posición del cadáver

Inspección primaria

Cavidad torácica y abdominal

Eviscerado

Pulmón

Corazón

Cavidad abdominal

Articulaciones, huesos y músculos

Encéfalo

Observaciones

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

La necropsia es un arma indispensable del médico veterinario en el tratamiento, prevención, control y erradicación de las enfermedades de los animales. En este capítulo se revisan brevemente los aspectos más relevantes de un diagnóstico *postmortem* tal y como se debe llevar a cabo en el laboratorio o a nivel de campo o consultorio. Se citan algunos de los riesgos y accidentes más comunes que pueden ocurrir, así como también la importancia de llevar a cabo una eutanasia en el caso de que los animales sean presentados vivos. Se discuten brevemente los componentes de toda buena necropsia, incluyendo las técnicas mismas de este procedimiento, la importancia de la interpretación correcta de los hallazgos y la forma en que estos deben ser descritos.

EUTANASIA

Aunque en la mayoría de los casos los animales enviados para necropsia están muertos, en otros los animales son presentados vivos, requiriendo ser sacrificados en forma humanitaria. Recibir animales vivos tiene la ventaja de que permite observar signos clínicos a veces no percibidos por los dueños, así como tomar muestras de sangre, médula ósea, orina, líquido sinovial, cefalorraquídeo, etc. Los cadáveres frescos facilitan la interpretación histopatológica, pues no muestran muchos de los artificios de autólisis que se observan en animales que han estado muertos por varias horas. Esto es particularmente valioso cuando se desean hacer estudios de microscopía electrónica para fines diagnósticos o de investigación.

Para detalles sobre como realizar una eutanasia humanitaria en animales, ya sea con métodos químicos (barbitúricos, compuesto T-61, anestésicos inhalados, etc.) o mediante métodos físicos (bala cautiva, dislocación del cuello, electrocución, etc.), se recomienda leer la literatura citada al final del capítulo. Es importante enfatizar que antes de comenzar una necropsia es indispensable cerciorarse de que

el animal esté muerto o totalmente inconsciente, revisando cuidadosamente los reflejos palpebrales, plantares, etc.

PRECAUCIONES AL HACER UNA NECROPSIA

Uno de los riesgos más peligrosos al realizar una necropsia es la posibilidad de contraer una enfermedad zoonótica. Por esto es imprescindible que tanto el patólogo como sus ayudantes usen siempre guantes y ropa apropiada como lo son botas de hule, overol o bata de laboratorio. En casos donde se sospeche de una enfermedad transmisible al humano como la clamidiasis o la tuberculosis, se recomienda utilizar un cubre-bocas o máscara con filtro de aire.

Otra precaución que se debe tomar en cuenta al hacer una necropsia, es la de prevenir accidentes con cuchillos, bisturí, seguetas, sierras eléctricas, pistolas de perno cautivo, etc. Existen algunos ejemplos lamentables de mutilaciones por uso incorrecto de cuchillos, sierras y otros instrumentos punzo-cortantes. Más triste aún, un estudiante de veterinaria en los Estados Unidos murió cuando se cercenó accidentalmente la arteria femoral al estar haciendo una necropsia. Todos estos accidentes pueden ser evitados si se toman las precauciones necesarias.

Se debe tener cuidado con las astillas punzo-cortantes de hueso que se forman al cortar o quebrar tejido óseo. Esto es particularmente peligroso cuando se manejan huesos de la cavidad craneal de animales con rabia (véase la página 169).

Como medida adicional de seguridad, es recomendable tener a la mano un recipiente con tapa para desechar material usado como agujas, hojas de bisturí, materiales de vidrio, etc.

CONTRAINDICACIONES DE NECROPSIA

Nunca se debe hacer la necropsia en animales sospechosos de ántrax (fiebre carbonosa) debido al alto riesgo que existe de contraer la

infección. Otra razón por la cual no se debe efectuar la necropsia de estos animales es la gran resistencia que tiene el *Bacillus anthracis* a los desinfectantes comunes, por lo que se dificulta la desinfección completa de equipo, material y lugares infectados (véase la página 217 del capítulo sobre desinfectantes). Cuando se sospeche de ántrax se recomienda hacer únicamente un frotis de sangre y teñirlo con Wright, Giemsa o azul de metileno (véase la página 76 del capítulo de histoquímica) para determinar si existe la presencia de numerosos bacilos encapsulados Gram positivos. En casos confirmados de ántrax, tanto los animales como sus desechos, se deberán esparcir con sustancias cáusticas capaces de matar las esporas (hidróxido de calcio) y enterrados a la brevedad posible en fosas profundas y lugares aislados.

HISTORIA CLÍNICA

Una buena historia clínica es muy importante para un buen diagnóstico *postmortem*. Lamentablemente por negligencia o tiempo, muchos clínicos omiten información valiosa, lo que dificulta hacer un diagnóstico correcto. Un ejemplo de una historia clínica incompleta podría ser: “El borrego estuvo enfermo y murió poco después de haberse iniciado el tratamiento.” En esta historia no se indica cuanto tiempo estuvo el borrego enfermo (horas, semanas, meses), cuales fueron los signos clínicos, cual fue el diagnóstico clínico y cual fue el tratamiento. Suponiendo que este era un caso de enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D, lo más probable es que no se hubiera podido llegar al diagnóstico correcto con sólo la necropsia, ya que las lesiones de esta enfermedad no son específicas y el aislamiento de esta bacteria a partir del intestino es difícil y de dudable valor diagnóstico (véase la página 111). Por otro lado, si hubiera habido una historia que indicara, por ejemplo, que hubo un cambio de alimentación en el hato formado por 55 borregos jóvenes, que tres de los animales

desarrollaron diarrea aguda seguida de salivación excesiva, convulsiones y muerte antes de 48 horas, hubiera sido suficiente para sospechar de enterotoxemia. En este caso, la necropsia pudo haber sido enfocada a confirmar el diagnóstico tentativo de enterotoxemia. Suponiendo que el animal tenía sólo una hora de muerto, una prueba de glucosa en orina mediante el uso de una tira reactiva (*dipstick*) hubiera sido confirmatoria para el diagnóstico de esta enfermedad.

La ignorancia de hechos importantes o la información malintencionada que a veces es proporcionada por los dueños o empleados son también obstáculos para una necropsia correcta. En el primer caso se trata de falta de observación. La expresión: “el animal se encontró muerto” no necesariamente indica que el animal murió súbitamente. Muchas veces los animales no son revisados con la frecuencia necesaria, por lo que una enfermedad aguda o subaguda de dos o tres días puede pasar desapercibida y mal interpretarse como “muerte repentina”. En algunos casos, la información proporcionada en la historia clínica es intencionalmente errónea. Un ejemplo de esto último sería: “el animal murió súbitamente”; sin embargo, al hacer la necropsia se encuentran evidencias de inyecciones en masas musculares o restos de medicamentos en el aparato digestivo. La información errónea se da con mayor frecuencia cuando los dueños o empleados de la explotación animal han “recetado” sus propios tratamientos antes de haber llamado al veterinario.

En resumen, una historia clínica completa y veraz facilita un buen diagnóstico a la necropsia. Una historia debe incluir siempre información acerca del número de animales en el hato, el número de animales enfermos o muertos (morbilidad y mortalidad), la introducción reciente de animales al hato, los cambios en el manejo o la alimentación, vacunaciones, tratamientos, curso de la enfermedad, signos clínicos, tiempo que tiene

el animal de muerto, etc. Cuando sea posible, el clínico deberá incluir también una lista de los diagnósticos clínicos diferenciales.

LA NECROPSIA COMO INSTRUMENTO DE DIAGNOSTICO

De acuerdo con el diccionario médico, una necropsia es la simple inspección de un cadáver. Sin embargo, una verdadera necropsia va más allá de la simple inspección, teniendo como objetivo final determinar la(s) causa(s) de enfermedad o muerte. En algunos casos, la necropsia permite hacer sólo un diagnóstico morfológico, como los serían los de un empiema pleural difuso, bronconeumonía crónica, meningitis supurativa, necrosis multifocal hepática, etc.; en otros casos es posible llegar directamente al diagnóstico etiológico como serían el de una rumenitis química en ganado de engorda, debido a una sobrecarga de granos, miopatía nutricional en becerros o corderos, debido a una deficiencia de vitamina E - Selenio, arteritis verminosa en caballos causada por *Strongylus vulgaris*, etc. Hay que tener en cuenta que en un buen número de necropsias no es posible encontrar lesiones macroscópicas, por lo que tampoco es posible llegar a ningún diagnóstico. Ejemplo de esto serían animales muertos por hipoglicemia, intoxicación por estricnina, rabia, etc., requiriéndose forzosamente de análisis auxiliares como son histopatología, bacteriología, toxicología, virología, etc.

En 1761, G. B. Morgagni¹ escribió: “*Los doctores que hacen o están presentes en muchas autopsias aprenden por lo menos a tener dudas; aquellos que no hacen o presencian necropsias, generalmente flotan en las nubes de optimismo incontrolado [ignorancia].*” El concepto de un “patólogo de escritorio” es una contradicción profesional. En Patología, como en cualquier otra disciplina, “la practica hace al maestro”, por lo que el mejor consejo que se

¹ En su obra “*De sedibus et causis morborum ner anatomem indagatis*” publicada en Venecia.

le puede dar al principiante es hacer más y más necropsias.

COMO HACER UNA NECROPSIA Y COMO INTERPRETAR LAS LESIONES MACROSCÓPICAS

La ejecución correcta de una necropsia incluye tres ingredientes fundamentales que son la disección mecánica del cadáver y que se basa en la destreza manual, la identificación de cambios morfológicos de acuerdo con la observación detallada de los diferentes órganos y tejidos, y la interpretación de dichos cambios con base a raciocinio y conocimientos generales de medicina. La falta de interés por parte del patólogo o clínico al hacer una necropsia generalmente resulta en una simple disección mecánica carente de elementos de observación e interpretación.

Existen diferentes tipos de cambios morfológicos que pueden ser identificados en la necropsia. **Lesiones**, son aquellos cambios morfológicos que ocurrieron durante la vida del animal y que son parte de la enfermedad; **hallazgos (lesiones) incidentales**, son aquellos cambios morfológicos que ocurrieron durante la vida del animal, pero que no están relacionados con la enfermedad principal o historia clínica. **Lesiones agónicas**, son aquellos cambios que se producen durante una agonía prolongada, como la congestión hipostática, el edema pulmonar causado por la sobredosis de barbitúricos de la eutanasia, etc. Los **cambios *postmortem***, son aquellas alteraciones que se observan a la necropsia, pero que ocurrieron después de la muerte del animal. Estos últimos son generalmente el resultado de imbibición de pigmentos, como la llamada **pseudomelanosis** cuando se combina el hierro de la hemoglobina con el ácido sulfhídrico producido por bacterias saprófitas; otros ejemplos serían el enfisema y dilatación gastrointestinal *postmortem* debido a proliferación de bacterias productoras de gas, el reblandecimiento de órganos y cambios de color por autólisis, la aspiración *postmortem* de contenido ruminal o gástrico, etc.

Muchos principiantes en patología confunden a menudo las alteraciones *postmortem* y las alteraciones patológicas.

Una **lesión primaria**, es aquella que forma parte integral del problema o enfermedad original, mientras que una **lesión secundaria**, es aquella que se origina como consecuencia de los cambios primarios. Por ejemplo, una endocarditis vegetativa debida a una infección bacteriana de la válvula mitral sería una lesión primaria, mientras que los infartos renales causados por obstrucción vascular a raíz del desprendimiento de trombos de la válvula afectada, serían las lesiones secundarias de este proceso. Para un diagnóstico correcto es importante poder diferenciar lesiones primarias y secundarias durante la necropsia.

Finalmente, es imperativo seguir un razonamiento lógico durante y después de la necropsia para lograr determinar cual o cuales fueron las **causas de muerte**. Para esto es necesario analizar cuidadosamente los hallazgos de necropsia y establecer la posible etiopatogénesis de cada una de las lesiones, poniendo toda esta información en contexto con la historia clínica. Por ejemplo, en un animal con historia de vómito por varias semanas y con hallazgos a la necropsia indicativos de uremia (úlceras en boca, calcificación de pleura, edema pulmonar, gastritis, etc.), sería lógico sospechar que las lesiones encontradas en los riñones y diagnosticadas como una nefritis intersticial crónica, hayan sido la causa principal del problema. Por otro lado, en un animal que murió con convulsiones en forma repentina, horas después de haberse utilizado un herbicida en sus alrededores, es poco probable que haya muerto de uremia a pesar de haberse encontrado lesiones de nefritis intersticial crónica. No hay que olvidar que los diagnósticos equivocados son causa de penuria para muchos patólogos (risa para otros) por no haberse utilizado un raciocinio correcto en la interpretación de lesiones.

COMO SE DEBEN DESCRIBIR LAS LESIONES MACROSCÓPICAS

Para finalizar un buen diagnóstico es imprescindible escribir un informe completo de todos los hallazgos e interpretaciones a la necropsia. En estos informes se debe utilizar lenguaje médico, términos precisos y nombres anatómicos correctos, incluyendo siempre la localización, forma, tamaño, color, consistencia y aspecto de las lesiones.

Para describir la localización de las lesiones se deben emplear términos anatómicos correctos², como por ejemplo: “en la médula y cálices renales de ambos riñones”, “en la región distal y dorsal del hueso metacarpiano”, evitando el uso de términos ambiguos como “en los riñones”, “en los huesos de las patas”, etc.

Cuando sea posible se debe describir la forma de la lesión con la mayor precisión posible. Habitualmente se utilizan términos geométricos como por ejemplo: úlceras “redondas”, “lineales”, “irregulares”, “piramidales”, etc. En algunos casos también se debe indicar si está “elevada” o “deprimida” la lesión con relación a la superficie o si tiene forma “nodular”, “umbilicada”, etc.

El tamaño, número, peso o volumen de la lesión debe ser estimado utilizando unidades y medidas, como por ejemplo: “dos abscesos de 3 y 7 centímetros de diámetro respectivamente”, “grandes cantidades de líquido (200-300 ml)”, “un tumor solitario de gran tamaño (2.5 kg)”, etc. El tamaño de las lesiones también puede expresarse utilizando el porcentaje o índice del órgano afectado, por ejemplo: “consolidación craneoventral de los pulmones afectando el 35% del parénquima pulmonar” o “afectando la mitad del páncreas”, etc.

Los cambios de color pueden describirse utilizando el tinte mismo como por ejemplo: “infartos rojos”, “conjuntiva amarilla”, etc., o también utilizando términos menos objetivos como: “mucosas pálidas”, “sangre oscura”,

“contenido verde-amarillento”, etc. El nombre de algunas enfermedades curiosamente se basa en el color de su lesión principal como en: “pierna negra”, “músculo blanco”, “lengua azul”, “ojo rosado”, etc.

La consistencia de la lesión u órgano afectado se describe según su textura a la palpación, utilizando vocablos como “suave”, “firme”, “duro”, “crepitante”, etc. Para describir el aspecto o apariencia generalmente se emplean términos como lo podrían ser: “nódulos calcáreos”, “necrosis caseosa”, “exudado purulento”, “líquido espumoso”, etc. Las apariencias de algunas lesiones han sido popularmente comparadas con ciertos alimentos, lo que se conoce como patología de “restaurante” o de “gourmet”. Ejemplos de estos nombres serían: “exudado cremoso”, “pericarditis de pan con mantequilla”, “empiema de sopa de tomate”, “olor a mantequilla rancia”, “del tamaño de una naranja”, etc. A pesar de su popularidad, muchos patólogos se oponen rotundamente a utilizar estos términos gastronómicos; Sin embargo, el autor de este capítulo aplaude su uso a pesar de no ser términos médicos.

TÉCNICA DE UNA NECROPSIA

Antes de describir como se debe hacer una necropsia, es importante mencionar que las técnicas de este procedimiento varían un poco entre las diferentes especies animales, así como también en la forma en que los patólogos de diferentes partes del mundo las llevan a cabo. En otras palabras, no existe una manera “universal” o “mejor” de como hacer una necropsia. Lo importante es llegar al diagnóstico correcto mediante la revisión cuidadosa y sistemática de todos los órganos y tejidos del animal.

En toda necropsia de debe identificar correctamente al animal revisando aretes, collares o tatuajes, así como la raza, edad, sexo, etc. Una vez identificado el animal, se debe leer cuidadosamente la historia clínica, poniendo atención a las pruebas específicas

² *Acta Anatómica Veterinaria.*

que el clínico o dueño hayan solicitado. Es recomendable también hacer un plan o estrategia mental de acuerdo a los signos clínicos o enfermedades que sospechemos. Este plan mental deberá seguirse durante la necropsia, con el objeto de facilitar la toma correcta de muestras y evitar olvidos.

Inspección externa

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

Posición del cadáver

La posición en la que debe ser puesto el animal para su necropsia, ya sea en el suelo o sobre la mesa, varía de acuerdo a la especie animal y a las técnicas personales de cada individuo. Para necropsias de rumiantes, perros y gatos, los animales se ponen generalmente en decúbito izquierdo con la cabeza al lado derecho y la cola al lado izquierdo del observador. Los caballos son generalmente puestos en forma opuesta, o sea, la cabeza al lado izquierdo y la cola al lado derecho del observador. La necropsia en cerdos se puede hacer como en los rumiantes, aunque muchos patólogos prefieren tenerlos acostados sobre la espalda mediante la desarticulación previa de los cuatro miembros.

Dependiendo de la especie animal, los miembros que queden en la parte superior del animal deben ser desarticulados y separados del resto del cadáver. Para hacer esto, se corta el miembro anterior por abajo de la región subescapular, separando la escápula de la

pared externa torácica. El miembro posterior se puede separar desarticulando con cuchillo la articulación coxofemoral o mediante el corte con segueta de la sínfisis del pubis. Es recomendable cortar la sínfisis del pubis cuando se sospechen lesiones en el sistema genitourinario.

Inspección primaria

Una vez separados los miembros, se procede a cortar la piel a lo largo de la línea media desde la boca al pubis, hasta que queden completamente expuestas la región ventral del cuello y las cavidades abdominal y torácica. El corte de piel se continúa hasta la parte distal de las extremidades. En este momento es recomendable examinar los nódulos linfáticos (pre-escapulares, pre-crurales, mandibulares y poplíteos), al igual que las tonsilas faríngeas y las glándulas tiroideas y paratiroides. También es útil cortar con segueta la sínfisis mandibular y separar las dos ramas de la mandíbula, pues esto facilita la inspección correcta de la cavidad oral. Los dientes deben ser cuidadosamente examinados para detectar enrazamiento irregular o maloclusión dental que pudieran estar relacionados con una pobre prensión o masticación del alimento.

Cavidad torácica y abdominal

La cavidad abdominal se abre haciendo una incisión en los músculos abdominales hasta que queden visibles las vísceras de esta cavidad. Hay que tener especial cuidado de no cortar el estómago o intestino en aquellos animales que tengan la cavidad abdominal distendida por gas. Una vez abierta la cavidad abdominal, se recomienda hacer una punción del diafragma con el cuchillo para investigar si existe presión negativa en la cavidad torácica. De ser así, el diafragma se retrae caudalmente generando al mismo tiempo un silbido que es causado por la entrada del aire a la cavidad torácica. La falta de retracción del diafragma ocurre en casos severos de neumonía”), edema pulmonar, pleuritis, hemotórax e hidrotórax severos, o enfisema pulmonar. La falta de

retracción del diafragma en un animal fresco y en el cual no se hayan encontrado lesiones torácicas es indicativa de neumotórax. La presencia de burbujas de gas en el mediastino es también indicativa de ruptura esofágica.

Para abrir el tórax se quita por completo un lado de la caja torácica, cortando con segueta o con costotomo todas las costillas en las uniones costovertebrales y a lo largo de los cartílagos costoesternales. Una vez expuestas en forma de “libro abierto” las cavidades abdominal y torácica se procede al examen general *in situ* de todas las vísceras. Es importante revisar el timo, particularmente en potros árabes que pudieran tener inmunodeficiencia combinada.

Eviscerado

Una vez examinados *in situ* todos los órganos torácicos, se procede a sacarlos de la cavidad. Se deben sacar juntos, por lo que es necesario cortar con el cuchillo los grandes vasos a la entrada del diafragma, las inserciones dorsales del mediastino y el ligamento esternopericárdico. Una vez afuera del animal, los órganos torácicos deben ser puestos sobre una mesa para proceder a examinarlos detalladamente. El esófago se abre con tijeras a todo lo largo y se revisa cuidadosamente la mucosa para detectar posible úlceras, cuerpos extraños impactados, o nódulos parasitarios.

De igual manera se abren la laringe, tráquea y bronquios. La presencia de espuma en las vías aéreas es indicativa de edema pulmonar, aunque hay que tener en cuenta que este se puede presentar en los estadios terminales de diferentes enfermedades.

Pulmón

Los pulmones deben ser cuidadosamente observados y palpados. Una textura más firme de lo normal es sugestiva de consolidación e inflamación, como lo es el caso de las bronconeumonías bacterianas. Una textura más elástica y presencia de **huellas costales** en las superficies pleurales son indicativas de una posible neumonía intersticial. Estas últimas

están frecuentemente asociadas a infecciones virales, septicemias, o a neumonías alérgicas o de origen tóxico. La presencia de **nódulos** en los pulmones puede ser debida a una neumonía de tipo granulomatosa, como la que se observa en casos de tuberculosis pulmonar, micosis sistémicas, etc. Los nódulos en los pulmones también pueden originarse a partir de infiltraciones tumorales. Los abscesos pulmonares son fácilmente identificados mediante la observación y palpación. Hay que tener especial cuidado de no confundir la **consolidación** pulmonar debido a procesos inflamatorios con **atelectasia**, la cual es el resultado del colapso pulmonar debido a pérdida de aire en el parénquima. El **enfisema** pulmonar aparece como un pulmón distendido con burbujas de aire, lo cual hace que su textura sea crepitante.

Una vez hecha la palpación, se pasa al corte del pulmón para investigar su apariencia interna y la presencia de posibles exudados en el parénquima. En casos de bronconeumonías fibrinosas es común encontrar pleuritis y adherencias pleurales, al igual que áreas irregulares de necrosis. En el caso de bronconeumonías supurativas se observa salir exudado purulento de los bronquios, especialmente cuando se presiona el pulmón con los dedos. En neumonías intersticiales generalmente no hay exudado visible, aunque en algunos casos puede encontrarse un enfisema o edema pulmonar severo. Para mayor detalle de como se observan cambios patológicos en los pulmones se recomienda leer textos de patología sistémica.

Corazón

La forma y tamaño del corazón y de los grandes vasos se deben revisar antes de cortar el saco pericárdico, observando si este último contiene exudados o trasudados. Existen varias formas de abrir el corazón, dependiendo de que tipo de problema cardíaco se sospeche. En la necropsia rutinaria, se acostumbra abrir el corazón mediante un corte en forma de “U” en la pared (flotante) del lado derecho, comenzando en el origen de la arteria pulmonar y

terminando en el otro lado de la aurícula derecha. El lado izquierdo se abre mediante un simple corte recto, desde el ápice hasta la aurícula izquierda. En caso de que se quiera comparar el grosor del tabique interventricular con el de los ventrículos, se puede comenzar la disección del corazón cortando transversalmente todo el órgano en el tercio inferior cerca del ápice. En términos generales, el ventrículo izquierdo es 2 a 3 veces más grueso que el derecho. Cambios en el grosor ocurren generalmente en hipertrofias y dilataciones cardíacas. Cuando se sospeche de hipertrofia cardíaca se recomienda pesar todo el corazón, y después pesar independientemente la pared del ventrículo derecho (sin septo), la del izquierdo (sin septo) y el tabique interventricular. Existen índices publicados que se pueden utilizar como guía para determinar si existe hipertrofia en uno de los lados del corazón. Luego de comparar el grosor del miocardio se procede de la misma forma descrita anteriormente.

En casos sospechosos de anomalías congénitas, es recomendable utilizar otra técnica, la cual requiere de la fijación previa en formol del corazón. Para esto se separa el corazón de los pulmones dejando intactos los grandes vasos, se limpian las cámaras de sangre inyectando agua con una jeringa de 50 ml, para finalmente sumergir todo el órgano en un recipiente con formol al 10%. Después de 48 horas de fijación, se hace un solo corte que va desde el ápice a la base del corazón a un lado de la arteria aorta.

Es importante revisar detalladamente las válvulas, el endocardio, el epicardio, los grandes vasos y finalmente el miocardio. Hay que tener cuidado de no confundir trombos con “coágulos” *postmortem* o con los llamados coágulos de “grasa de pollo.” También hay que recordar que el ventrículo izquierdo generalmente se encuentra vacío (sin sangre) en animales que estén o hayan pasado por el estado de *rigor mortis*.

Cavidad abdominal

Antes de sacar los órganos abdominales hay que cerciorarse de que no existan torsiones o desplazamiento de vísceras como en los casos de hernias, torsión gástrica o de abomaso, intususcepciones o vólvulos. El páncreas, que puede ser localizado fácilmente a un lado del origen del duodeno, y el bazo, debe de examinarse rutinariamente. Hay que asegurarse de que no haya obstrucción en el conducto colédoco, presionando la vesícula biliar (excepto en caballos), lo cual normalmente fuerza el paso de bilis al duodeno. Es recomendable mover temporalmente los intestinos fuera de la cavidad abdominal, empujándolos hacia un lado y por encima de la espalda del animal. Para evitar derrames de contenido digestivo se recomienda amarrar con cordón o hilo los extremos del esófago y duodeno antes de la región del cardias y píloro. Una vez hecho esto, se pueden jalar los pre-estómagos y abomaso hacia el observador hasta que se desprendan de sus inserciones. Para reducir la suciedad en la mesa y el piso se recomienda cortar estos órganos sobre una carretilla o dentro de un bote grande. Todos los pre-estómagos y estómago se deben abrir y observar cuidadosamente las mucosas, así como también el olor, color y consistencia de los contenidos. Es muy valioso lavar los pre-estómagos y estómagos con un chorro de agua, pues esto facilita su observación, particularmente cuando las lesiones son muy pequeñas. Las parasitosis se pueden cuantificar si fuera necesario (*véase la página 172 del capítulo de diagnóstico de parasitosis*).

Es importante revisar las glándulas adrenales situadas inmediatamente por delante de los riñones; en animales con mucha grasa a veces es más fácil localizar estas glándulas mediante una palpación suave del tejido perirrenal.

Los riñones se separan del animal y se cortan a lo largo de su superficie convexa, observando cuidadosamente la corteza, médula, papilas y pelvis renales. La cápsula se

desprende con pinzas y se observa si existen adherencias anormales entre esta y el parénquima.

El hígado se inspecciona primero dentro de la cavidad abdominal y luego se saca para revisarlo con cuidado sobre la mesa, haciendo varios cortes con cuchillo. Hay que poner atención a la textura, observar si existen cambios focales o zonales en el parénquima, fibrosis, engrosamiento de los conductos biliares o presencia de tremátodos.

En animales con problemas gastrointestinales se recomienda revisar el intestino en toda su extensión, abriéndolo con tijeras a lo largo de su inserción con el mesenterio. En necropsias de rutina se pueden revisar segmentos aislados de las diferentes partes del intestino, o en aquellas porciones que parezcan estar afectadas. La mucosa y contenido intestinal se examinan con cuidado, al igual que los conductos³ y nódulos linfáticos mesentéricos. Cuando sea necesario se debe también lavar la mucosa para facilitar la detección de placas linfáticas intestinales (de Peyer) así como la de alteraciones poco visibles.

Una vez vacía la cavidad abdominal se procede a revisar los ureteres, vejiga urinaria y uretra. Para esto es aconsejable sacar todas estas estructuras juntas y abrirlas sobre la mesa. En casos de hidronefrosis es importante tratar de localizar el sitio y la causa de obstrucción. De igual manera, el aparato reproductor puede ser sacado del animal y revisado cuidadosamente sobre la mesa de necropsias.

Articulaciones, huesos y músculos

Se deben abrir varias articulaciones en forma rutinaria y observar el volumen (efusión sinovial), turbidez y apariencia del líquido sinovial, al igual que los cartílagos articulares, membranas sinoviales, ligamentos y cápsulas articulares. Las articulaciones coxofemorales, femurotibio-rotulianas, las del tarso y carpo son las

más frecuentemente examinadas. En casos en que se sospeche, pero que no sea clara la evidencia de exudados, se recomienda aspirar líquido sinovial con una jeringa y observar a contraluz la posible presencia de estrías de fibrina (*véase la página 32 del capítulo de patología clínica*). Si se van a coleccionar muestras para aislamiento viral, deberán tomarse las precauciones necesarias (*véase la página 147 del capítulo de enfermedades virales*).

Se deben cortar uno o dos huesos largos longitudinalmente con sierra, para revisar la apariencia y textura del tejido óseo, al igual que la de los cartílagos de crecimiento y de la médula ósea.

En animales con diagnóstico presuntivo de linfoma / mieloma deben revisarse y tomarse muestras para histopatología de la médula ósea de varios huesos.

En animales con claudicaciones se deben desde luego abrir y examinar con especial atención los huesos y las articulaciones afectadas y de ser posible compararlas con las del lado opuesto o con las de un animal de edad y raza similar.

Las masas musculares se deben inspeccionar mediante numerosos cortes con cuchillo.

Encéfalo

Puede obtenerse líquido cefalorraquídeo en forma estéril con facilidad antes de extraer el cerebro (*véase la página 30 del capítulo de patología clínica*).

Para sacar el encéfalo es necesario separar con un cuchillo la articulación atlanto-occipital, cortando asimismo las meninges y médula espinal. Una vez separada, se corta la piel y se quitan los músculos temporales y otros tejidos en su alrededor. El encéfalo se puede sacar de varias maneras, dependiendo del tipo de animal, la edad y de si existen o no signos neurológicos. En gatos y perros recién nacidos, o animales de laboratorio, se pueden cortar los huesos con tijeras o cortahueso. También en animales recién nacidos, particu-

³ La dilatación de conductos linfáticos mesentéricos en rumiantes es sugestiva de paratuberculosis.

larmente en cerdos o aves, se puede hacer un corte longitudinal con el cuchillo de necropsias. Para esto se pone la cabeza sobre la mesa, se centra el filo del cuchillo a lo largo de la cabeza y se le da un golpe firme con la palma de la mano o un pedazo de madera. En animales mayores en los cuales no sea necesario hacer una inspección detallada, se puede sacar el encéfalo mediante un corte a lo largo y en la línea media de la cabeza utilizando una sierra eléctrica.

Finalmente, la forma más tradicional de sacar el encéfalo pero que requiere de tiempo y experiencia, se basa en tres cortes con segueta. Dos de ellos comienzan en el agujero magno a un lado de los cóndilos occipitales, cortando hacia adelante y superficialmente los huesos occipital y temporal de cada lado. El tercer corte se hace transversalmente algunos centímetros por atrás de las órbitas oculares hasta unir los dos cortes laterales. Con un cincel se levanta la tapa del cráneo y con tijeras se cortan las paquimeninges. Antes de sacar el encéfalo es necesario cortar los nervios craneales. Para mayores detalles de como sacar el encéfalo se recomienda consultar las referencias de Aluja y de Andrews. Una vez fuera el encéfalo, se revisa internamente la cavidad craneal incluyendo la glándula pituitaria y el ganglio del nervio trigémino (de Gasser).

La toma de muestras para el diagnóstico de rabia se describe en el capítulo correspondiente (véase la página 160).

Ojo, oído, cavidad nasal y senos

Para sacar los ojos se recomienda hacer un corte periocular de la piel. Utilizando unas pinzas de diente de ratón, se hace tracción en la piel y se cortan con tijeras los músculos oculares y el nervio óptico.

Los ojos enteros, libres de músculos periorbitales, usualmente se fijan por inmersión en formalina al 10% amortiguada con fosfatos por 3 a 5 días. No es necesario ni conveniente inyectarles formol ni hacerles “ventanas” para que se fijen adecuadamente.

Una vez fijados, los ojos se revisan por transiluminación⁴, antes de cortarlos. Se corta transversalmente el nervio óptico y después se practican dos cortes al ojo; de tal forma que la sección central (que se usará para histopatología) incluya córnea, iris, cristalino, retina y nervio óptico.

Es importante hacer varios cortes con sierra o segueta para revisar el oído medio e interno, al igual que la cavidad nasal y senos.

OBSERVACIONES

La práctica de los procedimientos sugerirá cambios, adiciones y omisiones a las técnicas descritas para adecuarlas a las condiciones locales.

Algunas de las enfermedades descritas son de notificación obligatoria en diferentes países de Latinoamérica, por lo que conviene consultar la legislación local vigente. Asimismo, la eliminación de desechos de necropsias debe realizarse según las normas aprobadas.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Anónimo: *Humane Killing of Animals*. The Universities Federation for Animal Welfare. England, 1978
- Aluja A.: *Manual de necropsias en los mamíferos domésticos*. Compañía Editorial Continental, S.A. México, 1980.
- Andrews, E. J. *et al.*: Report of the American Veterinary Medical Association panel on euthanasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 202: 230-249, 1993
- Andrews, J. J., Van Alstine W. G. and Schwartz K. J.: A basic approach to food animal necropsy. In: Andrews, J. J.: *Necropsy techniques*. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice Vol. 2. W. B. Saunders, Toronto, Ontario, Canada, 1986
- Bennett, B. T.: Proper and improper ways to use electrocution for euthanasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 204: 1000, 1994.

⁴ En forma similar a como se examina la viabilidad de los embriones de pollo. El ojo normal transmite bien la luz, excepto por el iris, cuerpo ciliar y nervio óptico.

- Blackmore, D.K.: Euthanasia; not always Eu. *Australian Veterinary Journal* 70:(11)409-413, 1993.
- Emanuele, P.V.: *Histotecnología ocular*, en: Prophet E.B. *et al* (editores): *Métodos histotecnológicos*. Pp 111-123. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas, Registro de Patología de los EEUUAA, Washington, D.C. EEUUAA, 1995.
- Gyles, C. L and Thoen C.O.: *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2nd ed. Iowa State University Press, Iowa, U. S. A, 1993.
- Johnson, D. D and Libal, M. C. In: Andrews, J. J.: *Necropsy techniques*. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice Vol. 2. W. B. Saunders, Toronto, Ontario, Canada, 1986.
- King, J. *The Necropsy Handbook*. Cornell University, Ithaca, New York, USA, 1986.
- King, L. S. and Mehhan M. C.: The history of autopsy. A review. *American Journal of Pathology* 73:514-544, 1973.
- Ruth, G. R. Necropsy of adult cattle. In: Andrews, J. J.: *Necropsy techniques*. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice Vol. 2. W. B. Saunders, Toronto, Ontario, Canada, 1986.
- Thacker, H. L. Necropsy in feeder pig and adult swine. In: Andrews, J. J.: *Necropsy techniques*. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice Vol. 2. W. B. Saunders, Toronto, Ontario, Canada, 1986.
- Thomson, R. G. *Anatomía patológica general veterinaria*. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza, España, 1978.
- Trapp, A. L. and Taylor, R. F. Methods of euthanasia in poultry and food-producing animals. In: Andrews, J. J.: *Necropsy techniques*. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice Vol. 2. W. B. Saunders, Toronto, Ontario, Canada, 1986.
- Trigo F. *Patología Sistémica Veterinaria*. 2ª ed. Interamericana, México, 1992.

Investigación de abortos y mortalidad perinatal

*Germán Valero Elizondo
Humberto Ramírez Mendoza
Jorge L. Tórtora Pérez*

Introducción

Necropsia de fetos y neonatos

Examen de humor acuoso fetal

Examen de fetos abortados

Examen de animales recién nacidos

Determinación de la edad fetal

Examen del contenido abomasal fetal

Abortos e infertilidad en cerdos

Comentario final

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

Existen buenos textos de patología sistémica veterinaria que tratan la patogenia y descripción de abortos, por lo que en este capítulo sólo se comentarán aquellas técnicas que son de utilidad para el diagnóstico de abortos y mortalidad perinatal.

NECROPSIA DE FETOS Y NEONATOS

Los fetos y animales recién nacidos se revisan de forma similar a los demás casos (*véase el capítulo de la página 11*). Antes de comenzar la necropsia debe leerse la historia, interrogar al cliente y preparar el equipo y material necesario para tomar las muestras que se requieran para comprobar o descartar los diagnósticos presuntivos. Es muy importante

que el clínico remita el feto completo más la placenta refrigerados; para esto se prefiere hielo seco, pero pueden emplearse congelantes (bolsas de plástico llenas de gel) de los usados para transporte de vacunas o bolsas de plástico dobles con hielo.

Rutinariamente se tomarán las siguientes muestras:

- Para **aislamiento de bacterias y virus**: Contenido estomacal o abomasal (*véase la página 24*) y grandes trozos (obtenidos asépticamente y refrigerados dentro de bolsas de plásticos) de placenta, un lóbulo de pulmón y otro de hígado.
- Para **histopatología**: pequeños trozos fijados en Bouin o formalina al 10% de placenta, cordón umbilical, pulmón, adrenal, hígado, corazón, encéfalo, riñón con grasa perirenal y bazo.
- Para **toxicología**: muestras congeladas de humor acuoso y grandes trozos de hígado, riñón y grasa perirenal.
- Para **observación inmediata en microscopio** de contraste de fases o campo oscuro (*véase la página 55 del capítulo sobre uso del microscopio*), improntas húmedas entre portaobjetos y cubreobjetos de contenido estomacal o abomasal (*véase la página 24*), humor acuoso (*véase más adelante*) y frotis de placenta, bazo y lesiones fetales. Si no se tiene un microscopio equipado para contraste de fases o campo oscuro, las improntas y frotis se pueden fijar a la flama de un cerillo o mechero, para después teñirlos con HE, Giemsa, Gram, Köster, Ziehl-Neelsen, Warthin - Starry, PAS o Papanicolau (*véanse las páginas 76 a 84 del capítulo sobre histoquímica*).

Cuando se sospeche torsión del cordón umbilical, se disecarán venas y arterias para detectar trombos.

EXAMEN DE HUMOR ACUOSO FETAL

El líquido de la cámara anterior del ojo puede proporcionar información valiosa en algunos casos.

En abortos por *Leptospira*, se pueden observar y aislar las leptospiras a partir del humor acuoso del feto (*véase el capítulo de leptospirosis en la página 140*).

En la mayoría de las intoxicaciones comunes se puede determinar la presencia del tóxico en el humor acuoso. Esto resulta importante cuando no es posible obtener la muestra de elección; por ejemplo, en el aborto por nitritos y nitratos en rumiantes.

EXAMEN DE FETOS ABORTADOS

Es importante evaluar las placentas junto con los fetos abortados. En muchos casos, la histopatología de placenta puede proporcionar información de valor diagnóstico. Muchos de los abortos infecciosos de los animales domésticos cursan con placentitis. Las características de la placentitis suelen ser indicativas del tipo de agente causal.

En el caso de toxoplasmosis, resulta más fácil demostrar la presencia de los taquizoitos y merozoitos de *Toxoplasma gondii* en la placenta que en el feto.

En el síndrome disgenésico y respiratorio del cerdo (*PRRS*) las lesiones son más evidentes en placentas que en fetos.

En casos de miocarditis por *Neospora* u otras causas, puede encontrarse el hígado con aspecto de nuez moscada.

En bovinos es muy importante hacer histopatología de cerebro y corazón del feto, pues *Neospora canis* es una causa frecuente de aborto, y a menudo las lesiones en el feto sólo son observables en estos órganos. En cerca de la mitad de los abortos bovinos por *Neospora*, el protozooario no es observable en la histopatología con H.E., requiriéndose la inmunohistoquímica.

EXAMEN DE ANIMALES RECIÉN NACIDOS

Los cadáveres de animales recién nacidos se revisan en forma similar a la antes descrita.

- La cantidad de grasa perirenal indica el estado nutricional. Los animales que nacieron y después murieron de inanición/exposición suelen tener atrofia serosa de la grasa perirenal. Esta lesión también se observa en casos de daño crónico en placenta, acompañada de un pobre desarrollo de la musculatura del producto.
- Las pezuñas se revisan para ver si el animal nació vivo y caminó, lo que se observa como desgaste de los cojinetes blandos con que nació.
- La atelectasia pulmonar denota que el animal no respiró, por lo tanto nació muerto.
- La presencia de hemorragias subcutáneas en la porción occipital son indicativas de traumatismo, que es la principal causa de mortandad perinatal de venados en cautiverio y otras especies característicamente *nerviosas*.
- Se revisa el contenido del abomaso o estómago. La presencia de leche coagulada en el estómago o abomaso indica que el animal si había sido amamantado, no fue abandonado y no murió de inanición.
- El color amarillo superficial de la piel de fetos y neonatos se debe al meconio expulsado al líquido amniótico, una reacción que se asocia al sufrimiento fetal.
- La presencia de meconio, líquido amniótico y células epiteliales escamosas (de piel) dentro de vías aéreas en pulmón denota sufrimiento fetal. Recientemente se ha caracterizado un síndrome de aspiración de meconio en becerros como un problema muy frecuente e importante. El meconio tiene un color café - dorado y puede teñirse con las coloraciones para pigmentos biliares (*véase la página 1*). La confirmación de las células escamosas aspiradas dentro del pulmón fetal puede hacerse con una tinción para queratina (*véase la página 1*).

DETERMINACIÓN DE LA EDAD FETAL

Todos los fetos deberán pesarse y medirse antes de comenzar la disección. La talla y peso fetal son indicativos de la edad fetal. Si se conoce la edad gestacional, la talla y peso indicarán si el desarrollo fetal es adecuado o hay retraso en el crecimiento. El pobre desarrollo de los fetos suele ser causado por lesiones crónicas en la placenta que interfieren con la nutrición del feto.

La determinación de la edad fetal en los animales domésticos suele hacerse mediante la medición de la distancia de los párpados a la base de la cola y la observación sobre el patrón de aparición de pelo, pestañas, pezuñas, etc. Estos datos se comparan con un cuadro o gráfica para la especie, raza y condiciones locales.

La determinación química de lípidos del surfactante pulmonar, una medición común sobre la maduración del pulmón fetal del humano, rara vez se emplea en medicina veterinaria. En forma similar, la amniocentesis, que es un procedimiento común en medicina humana, es poco frecuente en medicina veterinaria, probablemente debido a que los animales domésticos suelen tener una proporción mucho menor de anomalías cromosómicas graves o errores congénitos del metabolismo en comparación con los humanos.

En el **bovino** holandés, el desarrollo fetal puede estimarse con la siguiente fórmula⁵, que proporciona la edad fetal en meses a partir del tamaño fetal medido de los párpados a la base de la cola, en centímetros:

$$\text{edad fetal} = \sqrt{\text{talla fetal} * 0.7}$$

Las características de los fetos de diferentes edades se presentan en los cuadros 1 (*página 1*) a 5 (*página 1*).

⁵ Ball, L.: Pregnancy diagnosis in the cow, in: Morrow, D. A. (editor): *Current Therapy in Theriogenology*. p 229-235. W. B. Saunders, Philadelphia, 1980.

EXAMEN DEL CONTENIDO ABOMASAL FETAL

El feto normalmente deglute constantemente el líquido amniótico que lo rodea. Si hubiera bacterias y exudados en el líquido amniótico, estos serán ingeridos por el feto. Al examinar los fetos, conviene colectar contenido estomacal o abomasal en forma aséptica usando jeringa y aguja gruesa estériles, y quemando la pared del abomaso con un cerillo antes de puncionar. El contenido abomasal fetal normalmente es de aspecto mucoso claro, muy denso y transparente; cualquier turbidez denota presencia de exudado inflamatorio.

El líquido abomasal colectado en forma aséptica es una excelente muestra para aislamiento bacteriano en los abortos infecciosos de este origen. Además de remitir la jeringa al laboratorio de bacteriología, debe examinarse una parte de este líquido en el microscopio. Si se dispone de microscopía de campo oscuro o de contraste de fases (*véase la página 55*), se examina la muestra a diferentes aumentos; de lo contrario, se hace un frotis que se fija a la flama de un mechero o cerillo y se tiñe con Giemsa, Gram, Köster (*véanse las páginas 76, 77 y 81 del capítulo de histoquímica*) o H.E. El contenido abomasal fetal normalmente contiene células epiteliales escamosas descamadas de piel. La presencia de bacterias (p. ej.: *Brucella abortus*, *Campylobacter foetus*, *Streptococcus*, etc.) o protozoarios (p. ej.: *Tritrichomona foetus*) tiene valor diagnóstico. La presencia de leucocitos polimorfonucleares suele indicar una infección bacteriana, aunque también ocurre en la tricomoniasis bovina.

ABORTOS E INFERTILIDAD EN CERDOS

En las infecciones virales que alteran los parámetros reproductivos se ven involucrados tanto el pje de cría, como los fetos. Se pueden observar signos clínicos o presentarse de forma inaparente. La infección puede ocurrir a través del contacto sexual por vía genital, vía placen-

taria u oronasal, siendo ésta última la más frecuente.

Las enfermedades virales comúnmente involucradas en problemas reproductivos son:

VIRUS COSMOPOLITAS

- Adenovirus
- Enterovirus
- Parvovirus

ENFERMEDADES EXÓTICAS PARA MÉXICO

- Encefalitis Japonesa Tipo B
- Encefalomiocarditis
- Fiebre Aftosa

ENFERMEDADES DE PREVALENCIA VARIABLE SEGUN EL ÁREA GEOGRAFICA

- Aujeszky
- Diarrea viral bovina.
- Enfermedad del Ojo Azul.
- Estomatitis vesicular
- Fiebre porcina clásica
- Influenza porcina
- Síndrome disgenésico y respiratorio del cerdo (*PRRS*)

La lista de virus asociados a problemas reproductivos en cerdos es larga; algunos virus tienen baja prevalencia, unos pocos tienen distribución geográfica limitada, otros son cosmopolitas (presentes en prácticamente todo el mundo) y finalmente, algunos tendrán porcentajes de prevalencia variables, dependiendo del hacinamiento, proximidad de las granjas y programas de erradicación.

En términos generales, el daño embrionario o fetal dependerá de la etapa de gestación al momento de la infección:

- Cuando la infección es durante el primer tercio de la gestación, habrá reabsorción

embrionaria, y el principal signo será que la hembra repite el ciclo estral después de 21 días.

- Cuando la infección es durante el segundo tercio de gestación, se suele presentar la momificación o el aborto.
- Si la infección ocurre en el último tercio de gestación, y dependiendo del virus, las manifestaciones serán desde abortos y mortinatos hasta la ausencia de signos y lesiones, porque el virus resulta apatógeno para el feto. Cuando se presenta ésta última situación, el feto es capaz de generar respuesta inmune ante el virus, sobre todo cuando ha rebasado los 70 días de gestación. Por esta respuesta, en los mortinatos se pueden recuperar los líquidos corporales y detectar anticuerpos producidos por el feto durante el último tercio de gestación.
- En los recién nacidos se puede obtener suero a partir de sangre recuperada del cordón umbilical, con el que también se podrán detectar anticuerpos.

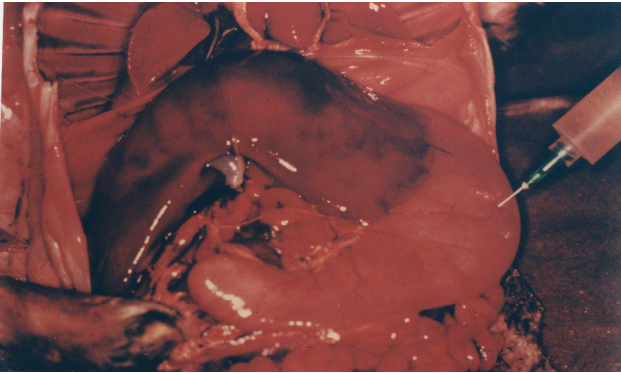
COMENTARIO FINAL

En México existen condiciones que han permitido la persistencia de la brucelosis bovina en algunos hatos. Aunque no siempre es factible el aislamiento o la observación al microscopio de *Brucella abortus* a partir de placentas y fetos abortados (*véase la página 81*), puede haber suficientes brucellas para lograr la infección de un prosector imprudente que maneje las muestras sin las precauciones necesarias. Existen Médicos Veterinarios portadores crónicos de *Brucella* que demuestran la ley de Murphy aplicada a las zoonosis.

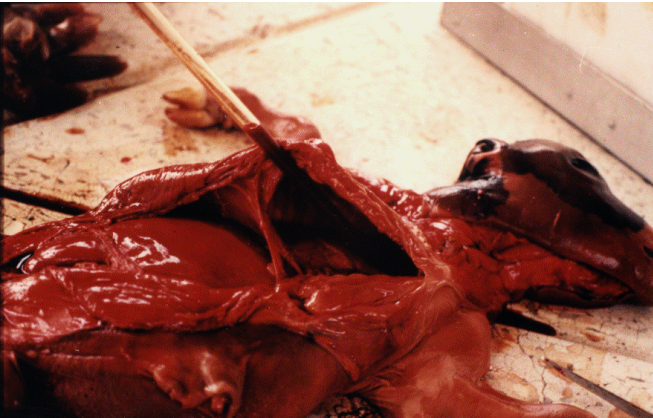
LECTURAS RECOMENDADAS

Las siguientes referencias pueden servirle al lector interesado en ampliar la información sobre diagnóstico veterinario de abortos:

- Kirkbride, C.A.: *Laboratory Diagnosis of Live-stock Abortion*. 3rd ed. Iowa University Press, Ames, Iowa, U.S.A., 1990.
- Miller, R. B.: Abortion, in: Morrow, D. A. (editor): *Current Therapy in Theriogenology*. pp 213-222. W. B. Saunders, Philadelphia, 1980.
- Ramírez M, H; Valero E, G; Morales A, J; Díaz A, E; Vázquez N, J.: Aborto porcino asociado a *Streptococcus* sp. *Veterinaria México* 21(1):51-52, 1990.
- Valero, G.: Patología del aparato reproductor, en: Trigo, F. (editor): *Patología sistémica veterinaria*. 2a. ed. Interamericana, México, 1992.



Toma de líquido abomasal fetal.



Toma de líquidos fetales para determinación de anticuerpos.

Cuadro 1. CARACTERÍSTICAS DE FETOS BOVINOS (Boyd, 1979; Gjesdal, 1969).

<i>Edad fetal (días)</i>	<i>Características</i>
30 a 45	Diferenciación de dedos, ollares, ojos.
60	cierre de párpados.
100 a 115	Son visibles los Folículos Pilosos intraepiteliales Alrededor de Labios (FPAL).
116 a 123	Erupción de FPAL.
125 a 140	FPAL de 3 a 5 mm.
146 a 150	FPAL de 6 a 7 mm.
152 a 158	FPAL de 8 a 10 mm.
161 a 174	FPAL de 10 a 12 mm.
161	Apertura de párpados.
175	FPAL de 12 a 20 mm.
200	Son visibles los folículos pilosos sobre el cachete.
195 a 210	Erupción de pelo en varias zonas.
210 a 231	Presencia de pelos densos cortos en todo el cuerpo.

Cuadro 2. TAMAÑO Y PESO FETALES DE CANINOS BEAGLE (Sokolowski, 1980)

<i>Edad fetal</i>	<i>Largo fetal en cm.</i>		<i>Peso en gramos</i>	
	<i>media</i>	<i>rango</i>	<i>media</i>	<i>rango</i>
20	7.0			
26	8.0		0.074	
28	12.0	11 a 13	0.244	0.191 a 0.258
30	15.5	15 a 16	0.426	0.420 a 0.432
32	19.0		0.79	
33	32.2	29 a 38	3.5	2.5 a 4.5
35	42.2	36 a 45	6.1	5.5 a 7.0
36	33.0			
37	46.0		7.0	
38	54.5	50 a 58	10.6	9 a 13
40	71.6	63 a 78	23.9	20 a 28
52	114.0	110 a 119	114.0	100 a 138
54	138.0	131 a 143	202.4	176 a 222
57	132.1	120 a 150	218.0	190 a 260
término	160.3	147 a 170	273.6	207 a 327

Cuadro 3. CARACTERÍSTICAS DE FETOS EQUINOS (Roberts, 1980)

<i>Edad fetal (días)</i>	<i>Peso fetal</i>	<i>Talla fetal (cm.)</i>	<i>Características</i>
16		0.32	
20		0.66	
25		0.6 a 0.85	
30	0.2 g	0.9 a 1.0	Los ojos, boca y yemas de las patas son visibles, sólo la vesícula coriónica está presente en el cuerno uterino.
35		1.5	
40		1.8 a 2.2	Aparecen párpados y orejas
45		2.0 a 3.0	
50		3.0 a 3.5	
60	10 a 20 g	4.0 a 7.5	Se observan labios, ollares y patas; párpados parcialmente cerrados; la placenta no está adherida aún.
90	100 a 180 g	10 a 14	Vellosidades placentarias presentes; pezones y cascos visibles.
120	700 a 1000 g	15 a 20	Genitales externos presentes; escroto vacío; la placenta está adherida.
150	1.5 a 3 kg	25 a 37	Puede o no haber pelo fino sobre cejas y punta de la cola; aún no se desarrolla el prepucio
180	2 a 5 kg	35 a 60	Pelo en labios, nariz, párpados, borde auricular, punta de la cola y crin.
240	12 a 18 kg	60 a 80	Pelo en crin, cola, lomo y partes distales de patas.
270	20 a 27 kg	80 a 90	Pelo corto y fino en todo el cuerpo.
300	25 a 40 kg	70 a 130	Todo el cuerpo cubierto con pelo corto; prepucio desarrollado; aumento en pelo de crin y cola.
330	30 a 50 kg	100 a 150	Pelaje completo y del color definitivo; testículos descendidos.

Cuadro 4. CARACTERÍSTICAS DE FETOS FELINOS (Berman, 1980)

<i>Edad fetal (días)</i>	<i>Peso fetal, (g) media y desviación estándar.</i>	<i>Talla fetal (cm.) media y desviación estándar</i>	<i>Características</i>
21	0.16 +- 0.09	1.48 +- 0.32	
28	0.89 +- 0.2	2.43 +- 0.46	Ojos y oídos abiertos, dedos sin garras.
35	4.98 +- 1.2	4.73 +- 0.90	Ojos y oídos cerrados, garras.
42	17.8 +- 5.6	7.24 +- 1.07	
49	40.7 +- 6.5	9.54 +- 0.90	Pelo corporal fino, sin patrón de color.
56	75.6 +- 15	11.7 +- 0.8	Pelo corporal completo con patrón de colores.
65	97.1 +- 23	13.7 +- 0.92	(Término)

Cuadro 5. CARACTERÍSTICAS DEL DESARROLLO DEL EMBRIÓN Y EL FETO OVINOS (Tórtora, 1993: información no publicada)

<i>Días</i>	<i>Características</i>
1..1½	En el ampulla se inicia la segmentación de la célula huevo o cigoto. <i>Se detecta EPF en el suero materno</i>
3..4	Se encuentra en el oviducto una mórula de aproximadamente 120 micras.
6..7	Ya en el útero se inicia la cavitación del blastocisto esférico de 150 a 170 micras.
8..9	El blastocisto esférico ya presenta una cavidad evidente (blastocelo), y se ha diferenciado el trofoblasto del botón embrionario.
9	El blastocisto sale de la zona pelúcida, mide entre 20 y 300 micras.
10	El blastocisto esférico comienza a contactar con el endometrio.
11	El blastocisto comienza a alargarse, el saco coriónico mide 6 mm y el disco embrionario 0.07 mm.
12..13	El saco coriónico mide de 0.6 a 3 cm. por 1 mm de ancho, el disco 0.1 a 0.5 mm. En el disco ya se observa la línea primitiva y comienzan a notarse los pliegues amnióticos. <i>Del día 12 al 22 se secreta trofoblastina o TP1. Del 13 al 21 una glicoproteína de alto peso molecular (66000), que bloquea la respuesta inmune. Aparentemente entre los días 12 y 14 se inicia la secreción de una gonadotropina coriónica.</i>
14	El saco coriónico mide 10 cm. de largo por 1 mm de ancho.
15	Se inicia el desarrollo de alantoides. <i>El embrión comienza a secretar estrógenos.</i>
16	El saco coriónico mide 15 cm. de largo por 1.5 mm de ancho; ya se ha iniciado la implantación. El embrión mide 4 mm y cuenta con 19 somites. <i>Se inicia la secreción de lactógeno placentario (oPL) y de PGF2E y PGE2 por el trofoblasto.</i>
17	Se completa la fusión del amnios; el alantoides crece notablemente; el embrión se flexiona en forma de C.
17..18	Se completa el cierre del tubo neural.
19	Aparecen los esbozos de los miembros posteriores.
20	Se inicia el desarrollo del ojo.
30..32	Aparecen los dedos y los cartílagos de los miembros.
34	Se hacen evidentes las orejas; termina el periodo embrionario.
42..49	Nariz y ojos diferenciados; aparecen folículos pilosos.
49..56	Se cierran los párpados.
98..105	Se inicia el desarrollo dental; aparecen cejas y pelos del hocico.
119..126	Aparece el pelo en todo el cuerpo.
147..156	Nacimiento.

Patología clínica

*Germán Valero Elizondo
René Márquez Márquez
Juan I. Monroy Basilio*

Introducción

Examen de exudados y trasudados

Evaluación de líquido cefalorraquídeo

Prueba de Pandy

Cultivo de LCR

Conteo de células en LCR

Evaluación de líquido sinovial

Examen de humor acuoso

Recuperación de células a partir de hisopos

Lectura recomendada

INTRODUCCIÓN

Existen numerosos textos de patología clínica en medicina humana y veterinaria, por lo que en este capítulo sólo se comentarán aquellas técnicas poco conocidas que son de utilidad para el diagnóstico rápido.

EXAMEN DE EXUDADOS Y TRASUDADOS

Los líquidos encontrados en la necropsia, paracentesis o cirugía, pueden examinarse en fresco entre porta y cubreobjetos en un microscopio de contraste de fases o de campo oscuro (*véanse las páginas 55 y 55*).

Generalmente el clínico está principalmente interesado en determinar si el líquido presente es de origen inflamatorio o neoplásico. Los problemas bacterianos se caracterizan por una gran afluencia de leucocitos polimorfonucleares. La morfología bacteriana suele proporcionar información suficiente para tener una lista corta de diagnósticos presuntivos, con los que se puede instaurar una

terapia, mientras se logra el aislamiento e identificación bacteriana (*véase la página 110*).

Las neoplasias asociadas a derrames pleurales o peritoneales se pueden diagnosticar en una proporción razonable mediante citología (*véanse las páginas 73 del capítulo de citología y 97 del capítulo de neoplasias*), permitiendo que el líquido sedimento sobre una laminilla (*véase más adelante*).

Si se tienen los recursos necesarios, se pueden obtener muestras útiles de las células y microorganismos presentes en un exudado al pasarlo a través de un filtro *millipore*; posteriormente, el filtro se desmonta, se fija, se deshidrata en alcoholes, se aclara en xilol, se hidrata y se colorea como si fuera un corte histológico, para finalmente montarlo entre porta y cubreobjetos.

EVALUACIÓN DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

En las necropsias de animales que presentaron problemas neurológicos, es conveniente tomar una muestra aséptica de líquido cefalorraquídeo (LCR) antes de extraer ojos y cerebro. Para la mayoría de las especies domésticas, el sitio de muestreo es la cara ventral de la articulación atlanto-occipital. Se hace una disección inicial hasta llegar a la cápsula articular, la que no debe cortarse. Usando un cerillo o encendedor se quema por 2 a 3 segundos la zona donde ha de puncionarse; se introduce una aguja con jeringa (de uno a 10 cc, según la especie) estériles apenas lo suficiente para atravesar la cápsula articular. Se ejerce una succión muy leve y se extrae cuanto líquido sea necesario. Inmediatamente después se tapa la aguja y se procede a examinar la muestra. El LCR normal es claro y transparente, permitiendo leer a través de un tubo lleno de LCR; cualquier turbidez sugiere la presencia de células o exudados. La contaminación del LCR con sangre puede corregirse parcialmente centrifugando la muestra, aunque en este caso no podrán

hacerse muchas de las pruebas bioquímicas, únicamente se podrá medir turbidez y evaluar la presencia de bacterias.

Prueba de Pandy / concentración de proteína en LCR

A un mililitro de líquido cefalorraquídeo se le añaden de una a cinco gotas de solución acuosa saturada de fenol (10 g fenol en 100 ml de agua destilada) y se observa la claridad o turbidez. El fenol coagulará las proteínas presentes, dando una turbidez leve en LCR normal y un aspecto turbio blancuzco en presencia de grandes cantidades de proteína. La presencia de grandes cantidades de proteínas sugiere un exudado inflamatorio que acompaña una meningitis o encefalitis, aunque también se presenta en algunas lesiones degenerativas.

En lugar de la prueba de Pandy pueden usarse tiras reactivas para urianálisis que puedan detectar proteína y/o nitritos. Usualmente el LCR normal debe indicar trazas de proteína en las tiras reactivas. La presencia de nitritos en una muestra fresca de un animal que no fue intoxicado con nitritos, revela la presencia de bacterias que metabolizan proteínas o urea. La presencia de nitritos en LCR en ausencia de bacterias sugiere intoxicación por nitratos.

Puede determinarse la concentración de proteínas en LCR usando un refractómetro, de la misma forma que se determina en suero o plasma. La concentración usual de proteínas en LCR de perros es de < 30 g/l, y de < 25 g/l en gatos

Cultivo de LCR

La muestra de LCR obtenida en forma aséptica es ideal para cultivo bacteriano. Particularmente, el aislamiento de *Listeria monocytogenes* es más fácil a partir de LCR que de cerebro, principalmente debido a que suele tomarse la muestra de la porción equivocada del cerebro. En los casos de listeriosis deben tomarse muestras del tallo y los pedúnculos cerebelares, tanto para histopatología como para bacteriología. Antes de cultivar la muestra

conviene observarla en un microscopio de campo oscuro. La morfología bacteriana sugerirá una lista corta de posibles bacterias causales, lo que le será muy útil al bacteriólogo para seleccionar sus medios y estrategias de aislamiento.

Conteo de células en LCR

El LCR normalmente contiene muy pocas células, menos de 8 leucocitos por microlitro. Se puede determinar la concentración de células usando un hemocitómetro (cámara de Neubauer), diluyendo 9 partes de LCR con una parte de solución colorante (0.2 g cristal violeta⁶, 90 ml de agua destilada y 10 ml de ácido acético glacial). Se cuenta en el hemocitómetro como si fuese conteo de leucocitos en sangre y se multiplica el valor por 1.1 para compensar por la dilución.

Se puede hacer un conteo diferencial de leucocitos en LCR, para lo que se requiere una centrífuga adaptada para usar laminillas. En laboratorios pequeños se puede intentar concentrar las células del LCR en presencia de una cantidad extra de proteína (para que las células se peguen a la laminilla). Se monta una jeringuilla de plástico de las usadas para tuberculina en un porta-objetos que tiene un trozo de papel filtro con una pequeña perforación central. Se añade LCR con un volumen igual de plasma o suero y se deja decantar 45 minutos. Después de este tiempo, el papel filtro habrá absorbido casi todo el líquido, dejando las células concentradas adheridas a la laminilla. Posteriormente se tiñe y cuenta como un frotis sanguíneo.

La cantidad y morfología de las células en LCR variará según las enfermedades presentes. En la polioencefalomalacia de los rumiantes hay una gran cantidad de macrófagos grandes con citoplasma espumoso. En las meningitis supurativas hay un predominio de polimorfonucleares, mientras que en las meningitis granulomatosas y no supurativas habrá mononucleares. Sin embargo, conviene

⁶ C.I. 42555, violeta de genciana, violeta básica 3.

recordar que algunas neoplasias como los meningiomas y casos de hemorragias intracranéas, pueden cursar con aumento de polimorfonucleares en LCR.

La presencia de eosinófilos sugiere parasitismo, toxoplasmosis, hipersensibilidad, neoplasia o intoxicación por sal en cerdos.

EVALUACIÓN DE LÍQUIDO SINOVIAL

El examen de líquido sinovial es particularmente útil en caballos y otros animales con claudicaciones.

La recolección del líquido articular se hará tan asépticamente como sea posible (véase la página 147). Es conveniente transferir una parte del material colectado en jeringa a un tubo de ensayo con anticoagulante. De requerirse el cultivo del líquido articular, se manda la jeringa tapada al laboratorio junto con el tubo con la muestra más anticoagulante.

En las especies domésticas el líquido articular es claro y transparente, con excepción del caballo, donde es amarillento. La presencia de ácido hialurónico le imparte una gran viscosidad, que permite formación de hilos de 2 o más cm. La reducción de viscosidad suele indicar un problema inflamatorio, que causa dilución con suero exudado y catabolismo por leucocitos. El líquido articular normal no coagula. La coagulación denota presencia de fibrinógeno por cambio inflamatorio.

La concentración de proteína en líquido articular normal es de 10 a 15 g/l. En caso de usar un refractómetro, el resultado debe tomarse con cautela, pues el índice de refracción del líquido articular es diferente al del suero, debido a la presencia del ácido hialurónico.

La concentración de células en líquido articular de perros es de menos de 3000 por microlitro, mientras que en caballos es de menos de 250 por microlitro.

La presencia de osteoclastos en líquido articular indica erosión del cartílago articular hasta el hueso subcondral.

Conviene recordar que a menudo se encuentra líquido articular aparentemente normal en animales con enfermedades articulares degenerativas. Por otra parte, los cambios en el líquido articular indican enfermedad.

EXAMEN DE HUMOR ACUOSO

El líquido de la cámara anterior del ojo puede proporcionar información valiosa en algunos casos.

En la mayoría de las intoxicaciones comunes (véase el capítulo en la página 34) se puede determinar la presencia del tóxico en el humor acuoso.

En la leptospirosis aguda (página 140), es posible observar en microscopía de campo oscuro (página 55) la forma y movimiento característicos de *Leptospira*, en muestras del líquido de la cámara anterior del ojo, aún en cadáveres con autólisis moderada.

Al morir un animal, las células del organismo pierden la actividad de la bomba de potasio, por lo que este catión empieza a difundir al tejido intersticial. En el caso del humor acuoso, la concentración de potasio guarda una importante correlación con el tiempo transcurrido desde la muerte, por lo que se utiliza en medicina forense para calcular con relativa precisión la hora de muerte. Si se quisiera usar la misma técnica en animales, debe contarse con una curva de calibración conteniendo muestras con tiempos de muerte conocidos para cada una de las especies domésticas.

RECUPERACIÓN DE CELULAS A PARTIR DE HISOPO

Es posible obtener células de muestras colectadas en un hisopo con la siguiente técnica:

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

eppendorf que a su vez contiene medio de transporte.

- Con alicates o pinzas para cortar uñas de perros, se corta la punta al tubo *eppendorf* y se coloca el tubo cortado dentro de un tubo para centrifugar de tamaño más grande (que tenga un poco de líquido fijador), que lo retenga del labio.
- El tubo grande se centrifuga en una centrífuga clínica.
- En el fondo del tubo grande se encontrará una pastilla (*pellet*) con las células que estaban en el hisopo.

LECTURA RECOMENDADA

Monroy, Valero, Márquez, González, Morales.
Patología Clínica Veterinaria. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios A.C, México, 1997.

Toxicología diagnóstica elemental

*René N. Márquez Márquez
Germán Valero Elizondo
René Rosiles Martínez*

Introducción

Plantas tóxicas comunes en México

Pruebas diagnósticas elementales

nitratos y nitritos
ácido cianhídrico
alcaloides
oxalatos

Intoxicación accidental de los animales domésticos

Prueba cualitativa para metales pesados (prueba de Reinsch)

Detección de estricnina

Micotoxinas

Observaciones

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

Sustancias tóxicas son aquellas que al ser ingeridas por el hombre o cualquier especie animal, o que a su simple contacto, provocan daños en los diversos órganos, aparatos o sistemas, pudiendo desencadenar la muerte o causar lesiones por la acción específica de diversos compuestos sobre el organismo.

PLANTAS TÓXICAS COMUNES EN MÉXICO Y LATINOAMÉRICA

El que una planta posea sustancias que afectan la salud de personas o animales puede deberse a compuestos sintetizados por la propia planta como constituyentes de su organismo, o bien a

la presencia de un microorganismo contaminante (como en el caso del hongo *Aspergillus flavus* que crece sobre diversos granos destinados para el consumo humano o animal). Otro caso es la captación excesiva de nitratos, selenio, molibdeno, arsénico, etc. existentes en los suelos en que crece la planta, o bien por la contaminación con fertilizantes, herbicidas, desechos industriales, aguas negras, fungicidas o insecticidas utilizados para proteger a los vegetales de plagas y pestes.

Las plantas tóxicas más comunes en México deben su toxicidad a su contenido de nitratos, oxalatos, cianuro, alcaloides, derivados de la pirrolizidina, epóxidos, taninos, saponinas, análogos de hormonas, etc.

En el caso de la ganadería, las pérdidas económicas por la ingestión de plantas tóxicas provoca graves problemas, sobre todo en los estados del norte del país, donde son muy acentuadas las variaciones climáticas y pueden ocasionar prolongados períodos de sequía, que obligan al sobrepastoreo de las tierras en las que crecen las plantas forrajeras y al consecuente consumo de vegetales tóxicos, aunado a que en el período de escasez de alimentos, disminuye la capacidad selectiva del ganado por las plantas forrajeras.

Todas estas variables se deben considerar con la intención de clasificar adecuadamente a un vegetal como tóxico. Se conoce que las condiciones climatológicas, estacionales, mantos freáticos y de los suelos, así como la etapa fenológica de la planta, pueden volver tóxica una especie que en otras condiciones o en otra etapa diferente de desarrollo ontogénico puede ser no sólo inocua, sino altamente útil para la alimentación y la salud. Otras variables de interés son la dosificación, la susceptibilidad por edad, estado fisiológico o nutricional, especie, etc.

En algunos casos, la causa directa de la muerte es la insuficiencia hepática o renal ocasionada por las lesiones acumuladas por una ingestión crónica, mientras que en otros

casos, la intoxicación se presenta como un cuadro agudo en primera exposición.

De acuerdo al principal componente tóxico de la planta se enlistan algunos ejemplos:

Alcaloides:

- Aconitum napellus* (acónito), distribuida en todo México.
- Ageratum conyzoides*, en todo México.
- Argemone mexicana*, (cardo o chicalote), en todo México.
- Astragalus woontonii* (hierba loca), norte de México.
- Centarium calycosum* (anisillo), norte de México.
- Conium maculatum* (cicuta), todo México.
- Crotalaria* sp., todo México
- Datura stramonium* (toloache), todo México.
- Lobelia berlandieri* (barba de guajolote), todo México.
- Senecio jacobea*, *Senecio vulgaris* (senecio), norte de México.

Dicumarina:

- Mellilotus officinalis* (trébol oloroso), en todo México.

Derivados de antracena:

- Karwinskia humboldtiana* (capulincillo o tullidora), norte de México.

Glucósidos cianogénicos:

- Acacia berlandieri* (guajillo), norte de México.
- Ageratum conyzoides* (sereno), sudeste de México.
- Crescentia cujete* (morro), sudeste de México.
- Cynodon dactylon* (pata de gallo, grama de Bermuda), todo México.
- Prunus* spp. (cerezo salvaje y cultivado), norte de México.
- Sorghum halepense* (maicillo), norte de México.

Trifolium hybridum (trébol híbrido), Sonora.

Zea maiz (maíz), todo México.

Nitratos:

- Amaranthus palmeri* (quelite), norte de México.
- Avena sativa* (avena), todo México.
- Beta vulgaris* (betabel), todo México.
- Salsola kali* (comunista), norte de México.

Oxalatos:

- Amaranthus retroflexus* (moco de guajolote), centro y norte de México.
- Monstera deliciosa* (mimbre), sur de México.
- Narcissus pseudonarcissus* (narciso), todo México.
- Sarcobatus vermiculatus* (hierba del borrego), Chihuahua.

Oxitóxicos:

- Chelidonium mayus* (golondrinera), todo México.

Saponinas (hepatonefrotoxinas):

- Agave* (lechuguilla), centro y norte de México.
- Drymaria arenaroides* (alfombrilla), norte de México
- Gutierrezia sarothrae* (romerito), norte de México.
- Lantana camara* (Lantana), todo México.
- Lupinus* spp. (altramuz), centro y norte de México.
- Nolina microcarpa* (palmilla), norte de México.
- Xanthocephalum microcephalum* ("perennial broomweed"), norte de México.

Taninos:

- Avercus* spp. (encino), todo México.
- Pteridium aquilinum* (helecho macho), zonas costeras y otras áreas húmedas de México.
- Quercus* spp. (roble), todo México

Toxoalbúmina:

Cassia occidentalis (habilla), todo México.
Jatropha curcas (piñoncillo), sudeste
Ricinus communis (higuerilla del diablo),
 todo México.

PRUEBAS DIAGNOSTICAS ELEMENTALES

Nitratos y nitritos

La presencia de nitratos y nitritos se puede demostrar en suero, orina, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, etc., del animal envenenado, por medio de ácido sulfúrico - difenilamina:

0.5 g de difenilamina disuelta en 20 ml de agua destilada. Se agrega lentamente ácido sulfúrico hasta completar 100 ml. Se deja enfriar y se pasa a frasco ámbar.

- Una gota del líquido se coloca en un portaobjetos y se adicionan tres o cuatro gotas del reactivo.
- La prueba positiva de nitratos se evidencia en 5 segundos con un color azul.
- Preferentemente se utilizarán líquidos desproteinizados con ácido tricloroacético.
- La misma prueba puede ser utilizada en una planta, extracto del alimento, o agua.
- Una prueba positiva en agua deberá de ser complementada con un análisis cuantitativo usando un electrodo específico para este ion.
- Debe recordarse que los rumiantes normalmente tienen cantidades bajas de nitratos y nitritos en rumen como productos del metabolismo bacteriano.

El exceso de nitratos en plantas producirá grandes cantidades de nitritos, las que, al ser absorbidas, cambiarán a la hemoglobina hacia metahemoglobina, la cual no funciona como acarreadora de oxígeno.

Si bien la administración de una dosis adecuada (para bovinos 8.8 mg/kg de peso por

vía endovenosa) de azul de metileno (al 1%), el tratamiento de elección para la intoxicación por nitritos y nitratos, produce mejoría inmediata, la administración de cantidades excesivas de azul de metileno provoca un aumento en la formación de metahemoglobina, agravando la hipoxia tisular.

Ácido cianhídrico (ácido prúsico)

Los glucósidos cianogénicos de las plantas son hidrolizados por el ácido clorhídrico estomacal o por la flora ruminal, liberando ión cianuro. El ión cianuro tiene gran afección por el hierro de la enzima citocromo oxidasa y su toxicidad se explica por la inhibición del transporte de electrones, que causa anoxia celular. Interesantemente, los tiocianatos (en brócoli, coliflor, col, betabel, soya y otras plantas) no causan intoxicación por cianuro, pero son bociogénicos.

Los niveles de ácido cianhídrico se pueden estimar en el forraje y el heno por la prueba de ácido pícrico. El muestreo es muy importante ya que los niveles de ácido cianhídrico no son homogéneos en un cultivo de sorgo o en un lote de heno. También se debe considerar que el ácido cianhídrico es volátil durante el muestreo y manipulación, de tal manera que la muestra se debe procesar en pocas horas y se utilizará para su transporte una bolsa de plástico en condiciones de refrigeración.

- En un tubo de ensayo se coloca el material vegetal fresco finamente cortado o el contenido gástrico del animal (3 a 50 g).
- Se agregan 10 gotas de ácido tartárico al 20% o 10 gotas de cloroformo.
- Inmediatamente se tapa el tubo con un tapón de hule al cual se le ha suspendido una tira de papel filtro impregnada en solución de ácido pícrico (5 g de carbonato de sodio y 0.5 g de ácido pícrico en 100 ml de agua; las tiras de papel filtro de 8 cm. se impregnan en esta solución y se secan al aire), evitando que se toque el fondo del recipiente o la muestra.

- Se incuba a 30 °C durante una hora.
- Si el papel vira de amarillo a rojo es positivo, concentraciones más bajas de cianuro dan la prueba positiva dentro de 24 horas.
- El límite de detección de ácido cianhídrico de esta prueba es de hasta 0.5 microgramos.

Alcaloides

Los alcaloides son un grupo heterogéneo de sustancias básicas nitrogenadas, insolubles en agua, pero solubles después de un tratamiento con ácido, con diferentes efectos farmacológicos y tóxicos:

- Los derivados de la pirrolizidina (en *Senecio* y *Crotalaria*) son hepatotóxicos.
- La estricnina de la nuez vómica (*Strychnos nux vomica*) que crece en Asia y Australia y de un arbusto trepador asiático (*Strychnos ignatii*) es tóxica para el receptor de glicina de las neuronas y antiguamente fue muy utilizada con fines criminales.
- La nicotina del tabaco (*Nicotiana* spp.) estimula los receptores colinérgicos y es una de las drogas legales más populares del siglo XX.
- La atropina y escopolamina extraídas de la belladona (*Atropa belladonna*), el toloache (*Datura stramonium*) y otras plantas solanáceas bloquean los receptores colinérgicos muscarínicos. Estos alcaloides son tan potentes que una gota de orina de un animal intoxicado era suficiente para causar midriasis cuando se le instilaba en el ojo a un gato (*véase la nota en la página 166*).
- Los opiáceos extraídos de la amapola (*Papaver somniferum*) se han empleado desde 1500 años antes de Cristo. Desafortunadamente causan adicción y dieron lugar al narcotráfico.

Los alcaloides de las plantas pueden ser detectados en contenido estomacal, orina, alimento o extracto de plantas, a través de

cromatografía en placa fina extrayendo la muestra con ácido clorhídrico 0.1 N.

- El extracto ácido se alcaliniza con hidróxido de amonio diluido y se extrae con cloroformo.
- El extracto clorofórmico se concentra y se gotea en una placa para cromatografía en capa fina.
- El corredor es 95% de metanol y 5% de hidróxido de amonio.
- Se utiliza como revelador el reactivo de yodoplatenato.

Cuadro 6. TÓXICOS COMUNES Y SUS CARACTERÍSTICAS.		
<i>Tóxico</i>	<i>Signos y síntomas</i>	<i>Resultados de laboratorio</i>
Arsénico (pinturas, herbicidas, plaguicidas)	Trastornos gastrointestinales, inquietud, calambres musculares, polineuritis, cambios en la pigmentación de piel, hiperqueratosis, presión arterial baja, ictericia, pérdida de peso, cirrosis hepática.	Oliguria, anuria, proteinuria, hematuria, anemia, deterioro de la función hepática, bilirubinemia, arsénico en el pelo, uñas y orina.
Compuestos clorados (DDT, clordano) y solventes (CCl ₄)	Fatiga, debilidad, anorexia, somnolencia, temblor, coma, ictericia, pérdida de peso, presión arterial baja, hepatomegalia, convulsiones, erupciones cutáneas.	Anemia, leucocitosis, oliguria, hematuria, proteinuria, disfunción hepática, compuestos organoclorados en orina y grasa corporal.
Flúor (rocas fosfóricas)	Trastorno general de la salud, pérdida de peso, anemia, osteopetrosis, osteoporosis.	Flúor en orina.
Plomo (pinturas, juguetes, gasolina, perdigones y balas)	Vómito, constipación, irritabilidad, convulsiones, vértigo, debilidad, dolor abdominal, pérdida de peso, letargo, parálisis nerviosa, palidez, línea azulosa en encías, ictericia.	Anemia, reticulocitosis, hematuria, proteinuria, coproporfiruria, presión y proteínas elevadas en LCR, aumento en la densidad subepifisiaria de los huesos.
Mercurio (pinturas, medicamentos, antisépticos, plaguicidas, fungicidas)	Estomatitis, salivación, diarrea, fotofobia, inquietud extrema, dolor muscular, dientes flojos, línea negra en encías.	Oliguria, anuria, proteinuria, mercurio en orina.
Organofosforados	Debilidad, ansiedad, temblor, vómito, disnea, miosis, cianosis, ptialismo, pulso lento.	Actividad de colinesterasa de eritrocitos disminuida.
Talio (insecticida, raticida)	Ataxia, letargo, trastornos gastrointestinales, conjuntivitis, alopecia, atrofia de piel.	Hematuria, proteinuria, eosinofilia, leucocitosis, talio en orina.

Oxalatos

Además de las plantas tóxicas que contienen oxalatos, la ingestión de etilenglicol provoca intoxicación por oxalatos. Los animales que ingieren accidentalmente anticongelantes automotrices que contiene etilenglicol lo metabolizan a ácido oxálico, que es tóxico para el epitelio de los túbulos renales, produciendo la misma sintomatología que la intoxicación por oxalatos.

Para su diagnóstico es importante considerar la historia clínica, signos y lesiones a la necropsia y puede ser confirmado con la observación histológica de cristales birrefrin-

gentes (bajo luz polarizada) de oxalatos en los túbulos renales (*véase la página 63 del capítulo de histopatología*), aunado al pH alcalino del rumen y la hipocalcemia de los animales.

INTOXICACIÓN ACCIDENTAL DE LOS ANIMALES DOMÉSTICOS

Los animales domésticos pueden ingerir accidentalmente o ser envenenados con diversos productos que se encuentran comúnmente en el hogar (*véase el cuadro de la página 38*). Dichos productos contienen ingredientes con alta capacidad tóxica, por ejemplo:

Insecticidas; organoclorados, organofosforados, arsénico, plomo, nicotina, etc.

Material de limpieza; hidrocarburos clorados, hidróxido de sodio, amoníaco, hipoclorito de sodio, ácido oxálico.

Cosméticos; sales de plata, anilinas, bromato de potasio, sulfuro de selenio, etc.

Pinturas; *thinner*, plomo, hidrocarburos clorados, ácidos, álcalis, acetato de etilo, acetato de amilo, alcohol metílico, ácido oxálico, etc.

Rodenticidas; fluoroacetato de sodio, fósforo, estricnina, bromuro de metilo, talio, bario, cianuros y warfarina.

En el cuadro 6 (*página 38*) se enlistan algunos de los tóxicos más comunes, los signos y síntomas asociados a ellos y los resultados de laboratorio con valor diagnóstico.

PRUEBA CUALITATIVA PARA METALES PESADOS (PRUEBA DE REINSCH)

Esta técnica se utiliza para el diagnóstico de intoxicaciones por metales pesados (arsénico, bismuto, mercurio, antimonio y plata):

- En un matraz se colocan 20 ml del contenido estomacal o 20 g de tejido (hígado y riñón) más 70 ml de agua destilada y 10 ml de ácido clorhídrico concentrado, junto con un alambre de cobre lavado en ácido clorhídrico.
- Si se utiliza tejido debe de estar perfectamente macerado.
- Se calienta por debajo del punto de ebullición durante 30 minutos.
- Una reacción positiva es cuando hay un depósito café oscuro en el alambre.
- La prueba puede detectar 2 ppm de arsénico en muestras líquidas o de 4 a 5 ppm en muestras sólidas.

DETECCIÓN DE ESTRICNINA

La estricnina es un tóxico muy potente que actúa sobre las sinapsis en médula espinal. Su diagnóstico es particularmente difícil porque no produce lesiones observables a la necropsia.

Se puede detectar estricnina en orina, riñón, contenido estomacal, líquido cefalorraquídeo o humor acuoso con la siguiente técnica (Stewart & Stolman, 1960):

- Homogeneizar tejido, sangre, orina o humor acuoso con 50 ml de agua. Se alcaliniza hasta pH 8.5 con hidróxido de sodio 0.2 N y se extrae con 100 a 200 ml de cloroformo.
- Se separa la capa clorofórmica y se realiza otra extracción con 20 ml de ácido clorhídrico 0.1 N. Este extracto ácido se alcaliniza hasta pH 8.5 con hidróxido de sodio 0.2 N y se vuelve a extraer con cloroformo.
- Se filtra el disolvente y se re-extrae el alcaloide (la estricnina) con 5 ml de ácido clorhídrico 0.1 N.
- Se mide la absorbancia a 255 nm en un espectrofotómetro.
- Para confirmar la presencia de estricnina, al extracto final en ácido clorhídrico se le añade un ml de ácido clorhídrico concentrado y de tres a cuatro granallas de zinc.
- El extracto se coloca en baño de agua hirviente por 10 minutos.
- Se extrae y se añade una gota de NaNO_2 al 10%. Un color rosa brillante denota una prueba positiva.
- La concentración se determina con auxilio de una curva de calibración a 540 nm (Stewart & Stolman, 1960).

MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, que crecen en diversos productos agrícolas almacenados a elevada humedad y temperatura.

Las micotoxinas pueden producir una gran variedad de daño potencial a los animales, además del riesgo a la salud humana al ingerir

productos de dichos animales. El impacto económico de la reducción de productividad, el incremento de la presentación de enfermedades asociadas a la inmunosupresión, el daño crónico a órganos vitales y tejidos, y la interferencia en la capacidad reproductiva son ejemplos de estos daños.

Es muy frecuente que los alimentos contaminados con metabolitos de hongos contengan más de un tipo de micotoxina, lo que potencia sus efectos tóxicos.

Para la cuantificación de micotoxinas existen diversos métodos:

- Cromatografía en capa fina.
- Cromatografía en minicolumna.
- Cromatografía líquida de alta resolución.
- Inmunoensayo enzimático (*ELISA*).

De los cuales existen en el mercado diversas marcas comerciales.

Aflatoxinas

Las aflatoxinas (bisfuranocumarinas poliinsaturadas) pueden causar daño hepático, disminución de la producción de leche y huevo, inmunosupresión, fallas vacunales, aumento de la sensibilidad a temperaturas extremas, aumento en la fragilidad capilar, pérdida de peso y disminución en la eficiencia alimentaria. Los animales jóvenes son más susceptibles y los animales lactantes pueden estar afectados por el consumo de metabolitos de aflatoxinas secretados en la leche. Niveles de 0.25 µg / kg de alimento pueden aumentar la susceptibilidad a infecciones y niveles superiores a 1500 µg / kg suelen causar la muerte.

Tricotecenos

Los tricotecenos son un amplio grupo de micotoxinas que causan necrosis y hemorragia en el tracto digestivo, disminución del proceso de regeneración sanguínea en médula ósea y riñón; además, causan daños en los órganos reproductivos. Los animales afectados muestran pérdida de peso, baja conversión alimenticia, inapetencia, vómito, alteraciones en el

emplume, diarrea sanguinolenta, coagulopatías, abortos y muerte. Dentro de los tricotecenos, la toxina T-2 y el DON son los que se encuentran con mayor frecuencia. Niveles superiores a 0.2 mg / kg de alimento causan lesiones en la mucosa oral de las aves.

Ocratoxina A

La ocratoxina A daña los riñones y en altas concentraciones puede dañar el hígado y el tracto digestivo, provocando disminución de la ganancia de peso, diarrea, deshidratación y aumento en la mortalidad. Niveles superiores a 0.3 mg / kg de alimento causan toxicidad en aves.

Zearalenona

La zearalenona mimetiza el efecto de los estrógenos, induciendo feminización a concentraciones en la dieta menores a una ppm, mientras que concentraciones más altas afectan la concepción, ovulación, implantación, desarrollo fetal y la viabilidad de los animales recién nacidos. Es especialmente importante en cerdos y aves.

Citrinina

La citrinina es un metabolito secundario de algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. En aves produce poliuria extrema, aumentando hasta tres veces la eliminación de agua en heces. A su vez, las camas húmedas predisponen a las aves a coccidiosis.

Deoxinivanelol (vomitoxina)

El deoxinivanelol es un metabolito secundario de algunas especies de *Fusarium*. En aves que ingieren niveles superiores a 16 mg / kg se produce cambios hematológicos y alteraciones en la química sanguínea.

OBSERVACIONES

Muchas de las sustancias tóxicas para los animales lo son también para el humano, por lo que debe siempre cuidarse el manejo adecuado de las muestras, las soluciones patrones, los reactivos y los desechos después de realizadas las pruebas.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Aguilar C, A. y Zolla, C.: *Plantas tóxicas en México*. I.M.S.S., México, 1982.
- Dreisbach, H. R.: *Manual de toxicología clínica*. 5ª ed. El manual moderno, México, 1984.
- Gosselin, R; Hudge, M; Smith T. & Gleason, J.L.: *Clinical toxicology of commercial products: acute poisoning*. 4th ed. Williams & Wilkins, U.S.A, 1985.
- Keeler, R.F; VanKampen, K.R. & Jamp, L.F.: *Effect of poisonous plants on livestock*. Academic Press, New York, U.S.A, 1978.
- Rosiles M, R. y Ocampo C, L.: *Memorias del primer curso de actualización en toxicología veterinaria*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México, 1981.
- Valero, G.: Patología del aparato reproductor, en: Trigo, J. F: *Patología Sistémica Veterinaria*. 2a ed. Interamericana, México, 1992.

Preparación de soluciones

Beatriz Arellano Reynoso

Introducción

Preparación de soluciones molares

Preparación de soluciones normales

Preparación de soluciones amortiguadas (*buffers*) y fisiológicas utilizadas en el laboratorio

Solución isotónica de cloruro de sodio

Solución amortiguada de fosfatos pH 7.2 a 7.4

Soluciones amortiguadas de fosfatos de pH 7.0 a pH 7.6

Solución de Hartman (lactato de Ringer)

Solución de Holmes (pH 9)

Soluciones fijadoras

Fijadores para conservación de antígenos y ácidos nucleicos

Fijador de Bouin

Fijador rápido de sublimado de mercurio

Fijador de Susa para rabia

Fijador de Zenker

Solución fijadora de Karnowsky

Solución fijadora de Davidson

Soluciones fijadoras de Klotz y de Jores

Fijación de piezas para museo

Alcohol - éter

Solución limpiadora (mezcla crómica)

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

Frecuentemente se necesita saber la cantidad precisa de soluto presente en una solución a una determinada temperatura. Dos ejemplos de unidad de concentración son la **molaridad** y la

normalidad. La primera se utiliza generalmente para soluciones de sales y la segunda para diluciones de ácidos o líquidos, aunque pueden usarse indistintamente. Para preparar soluciones en el laboratorio es necesario conocer los siguientes conceptos:

El **peso molecular** de una molécula es la suma de las masas atómicas o peso atómico de los átomos de la molécula.

Ejemplo: Peso molecular del $H_2O = 18$.

Pesos atómicos: $H = 1 \times 2 = 2$
 $O = 16 \times 1 = 16$
 $2 + 16 = 18$

Un **mol** es el peso de un compuesto numéricamente igual al peso molecular del mismo.

Pesos atómicos de sustancias frecuentemente utilizadas en el laboratorio

Al = 27	H = 1	P = 31
B = 11	K = 39	S = 32
C = 12	N = 14	Se = 79
Ca = 40	Na = 23	
Cl = 35	O = 16	

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MOLARES

La **Molaridad** de una solución expresa el número de moles de soluto por un litro de solución. Se podría decir también que una solución uno molar es la que contiene un mol de soluto en un litro de solución. La molaridad se abrevia con la letra **M** y sus unidades son: Número de moles/ litro.

Ejemplo: Para preparar una solución 1 M de cloruro de sodio (NaCl) se debe saber lo siguiente:

- Peso molecular del NaCl = 58

$$Na = 23, Cl = 35, 23 + 35 = 58$$

Un mol de NaCl pesa 58 g por lo que una solución 1 M de NaCl debe prepararse con 58 g de la sal más cbp (cuanto baste para) un litro de agua destilada (disolvente).

Para preparar una solución 1 M de ácido clorhídrico (HCl), que es un ácido gaseoso disuelto en líquido, el procedimiento es un poco más laborioso y se considera lo siguiente:

- Este ácido tiene una concentración del 37 %.
- Posee una densidad de 1.19 (1 litro pesa 1.19 kg).

Tanto la densidad como la pureza de un líquido son datos que se obtienen fácilmente de la etiqueta del frasco del reactivo, o de un catálogo de reactivos.

- Peso molecular del HCl = 36.

$$H = 1, Cl = 35, 1 + 35 = 36$$

Un mol de HCl pesa 36 g, por lo que se debe tener esa cantidad en un litro de agua para obtener una solución 1 M. Sin embargo, también se debe tomar en cuenta la densidad de esa sustancia y el que no está 100 % pura.

- Se determina cuánto ácido existe en un ml del reactivo y este dato se obtiene de la densidad: $d = 1.19 \text{ g/ml}$.

Se tendría 1.19 g de ácido en un ml de solución si fuera 100% puro, pero en este caso se tiene al 37%. Se calcula qué cantidad de ácido se tiene en realidad por medio de una regla de tres:

$$\begin{aligned} 1.19 \text{ g/ml} &\rightarrow 100 \% \text{ puro} \\ X &\rightarrow 37 \% \text{ de pureza} \\ X &= 0.44 \text{ g/ml} \end{aligned}$$

- Se necesita poner 36 g de HCl que está a una concentración de 0.44 g/ml.

$$\begin{aligned} 0.44 \text{ g} &\rightarrow 1 \text{ ml} \\ 36 \text{ g} &\rightarrow X \\ X &= 81 \text{ ml} \end{aligned}$$

- Se toman 81 ml de HCl de la botella y se agregan al agua (cbp un litro) para obtener una solución 1 M de HCl.

**NOTA: RECUERDE SIEMPRE
AGREGAR EL ÁCIDO MUY
LENTAMENTE AL AGUA Y NO
VICEVERSA.**

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES NORMALES

La **normalidad** de una solución es el número de equivalentes de soluto por litro de solución. La normalidad se expresa con la letra N; sus unidades son: Número de equivalentes / litro.

$$\text{Normalidad} = \frac{\text{No de equivalentes de soluto}}{\text{litros de solución}}$$

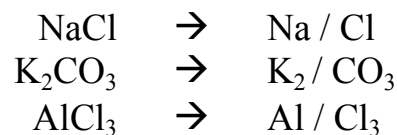
Y el número de equivalentes de una sustancia se encuentra de la siguiente manera:

$$\text{No. de equivalentes} = \frac{\text{Peso molecular de la sustancia}}{\text{peso equivalente}}$$

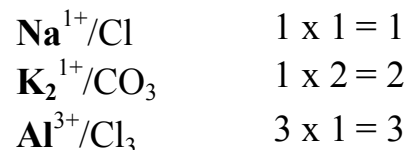
Para encontrar de forma sencilla el **peso equivalente** se siguen los siguientes pasos:

- Separar imaginariamente los iones de la fórmula.

Ejemplo:



- En seguida se considera la valencia positiva de la fórmula (la parte izquierda) y se multiplica por su suscrito:



- Este resultado es el número de hidrógenos reemplazables, o sea, la valencia positiva neta del compuesto.

- Y finalmente, el peso equivalente =

$$\frac{\text{peso molecular}}{\text{valencia positiva neta}}$$

Por ejemplo, para preparar una solución 2 N de CaCl_2 :

- Se obtiene el peso molecular.

$$\begin{aligned} \text{Ca} &= 40 \times 1 = 40 \\ \text{Cl}_2 &= 35 \times 2 = 70 \\ 40 + 70 &= 110 \text{ g} \end{aligned}$$

- Peso equivalente:

$$= \frac{110 \text{ g}}{2} = 55 \text{ g}$$

- Para preparar una solución 1 N de CaCl_2 se toman 55 g de la sal más cbp un litro de disolvente.

Por lo que para preparar una solución 2 N de CaCl_2 se pesan 110 g de la sal y se le agrega cbp un litro de disolvente.

Otro ejemplo: Preparar una solución 1 N de ácido sulfúrico (H_2SO_4).

- La pureza es del 96%
- La densidad es de 1.84
- Peso molecular:

$$\text{H} \rightarrow 1 \times 2 = 2$$

$$\text{S} \rightarrow 32 \times 1 = 32$$

$$\text{O} \rightarrow 16 \times 4 = 64$$

$$p.m. = 2 + 32 + 64 = 98$$

- Valencia positiva = $\text{H}_2^{1+}/\text{SO}_4$
 $1 \times 2 = 2$

- Equivalentes = $98 / 2 = 49 \text{ g}$

- Se debe poner 49 g de H_2SO_4 . Sin embargo, primero se determina cuánto ácido se tiene en un ml de solución y nuevamente este dato lo dice la densidad.

- Densidad = 1.84 g / ml.

Se tendrían 1.84 g / ml, si fuera 100 % puro, pero está al 96 %, por lo que:

$$1.84 \rightarrow 100 \%$$

$$X \rightarrow 96 \%$$

$$X = 1.76 \text{ g / ml}$$

- Si hay 1.76 g / ml y se necesitan tomar 49 g de H_2SO_4 total, entonces:

Si:

$$1.76 \text{ g} \rightarrow 1 \text{ ml}$$

$$49 \text{ g} \rightarrow X$$

$$X = 27.84 \text{ ml}$$

- Tomar 27.84 ml de la botella de ácido concentrado y se añaden al agua, cbp un litro, para preparar una solución 1 N de H_2SO_4

Cantidades en gramos y mililitros para preparar soluciones comunes *

	1 M	1 N	5 N
HCl	81 ml	81 ml	405 ml
H_2SO_4	55.2 ml	27.8 ml	139 ml
KOH	56	56	280
NaCl	58	58	290
NaOH	40	40	200
NH_4OH	140 ml	140 ml	700 ml
* = cbp 1 L de agua destilada			

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES AMORTIGUADAS (BUFFER) Y FISIOLÓGICAS UTILIZADAS EN EL LABORATORIO

Es recomendable preparar soluciones concentradas cuando se utilizan frecuentemente o en grandes cantidades; se les ajusta el pH y se esterilizan por autoclave o filtración si es necesario y se mantienen, ya sea en refrigeración o a temperatura ambiente. A estas soluciones se les llama solución madre o "stock". Cuando se requiere cierta cantidad a determinada molaridad, normalidad o porcentaje, solamente se diluyen sin tener que pesar o medir los diferentes componentes y sin necesidad de ajustar el pH. La fórmula que se utiliza es la siguiente:

$$\text{Vol}_i \cdot \text{Con}_i = \text{Vol}_f \cdot \text{Con}_f$$

Se despeja:

$$\text{Vol}_i = \frac{\text{Vol}_f \cdot \text{Con}_f}{\text{Con}_i}$$

donde:

Vol_i = volumen inicial (cuanto se tomará de la solución madre)

Con_i = concentración inicial (la molaridad, normalidad o porcentaje a que está la solución madre).

Vol_f = volumen final que se preparará.

Con_f = concentración final (la molaridad, normalidad o porcentaje a que se quiere la solución).

Ejemplo: Se tiene una solución madre de cloruro de sodio 5 M y se necesitan preparar 2 litros de cloruro de sodio 0.5 M ¿ Cuanto se toma de la solución madre para obtener la cantidad y molaridad deseadas ?

$$\text{Vol}_i = \frac{2\text{L} * 0.5 \text{ M}}{0.5 \text{ M}} = 0.2\text{L}$$

= 200 ml de la solución madre más cbp 2 litros de agua para obtener la solución 0.5 M.

La preparación de las soluciones de **Alsever**, y **solución salina amortiguada con veronal** se describen en la página 133, y el amortiguador de **glicina pH 7.8** se describe en la página 130, del capítulo sobre diagnóstico de brucelosis.

La solución **amortiguadora de citratos 0.01 M, pH 6** se emplea en la recuperación de antígenos que han sido fijados en exceso para inmunohistoquímica (*página 88*) e hibridación *in situ* (*página 93*).

Solución isotónica de cloruro de sodio (solución salina fisiológica)

Es una solución común de lavados. También se utiliza en el laboratorio de parasitología para realizar exámenes coproparasitoscópicos. Si se usa como terapia electrolítica para animales se debe tomar en cuenta que la administración en cantidades excesivas de ésta puede causar acidosis.

Cloruro de sodio..... 8.5 g

Agua destilada..... cbp 1 L

Solución amortiguada de fosfatos (PBS) pH 7.2 a 7.4

Es muy utilizada en lavados de preparaciones histológicas, tanto para microscopía óptica y microscopía electrónica; también en inmunohistoquímica diagnóstica o en la técnica de anticuerpos fluorescentes de rabia. Otros usos serían para realizar los lavados de la técnica diagnóstica de *ELISA* y preparar soluciones fijadoras.

Na ₂ HPO ₄	12.8 g
NaH ₂ PO ₄	⁷ 2.62 g
Cloruro de sodio	0.524 g
Agua destilada	cbp 1L

Se ajusta el pH con unas gotas de hidróxido de sodio 1 N o ácido clorhídrico 1 N, según sea necesario.

Soluciones amortiguadas de fosfatos 0.1 M de pH 7.0 a pH 7.6

Las soluciones amortiguadas de fosfatos (*PBS*) a concentración 0.1 M en los rangos de pH de 7.0 a 7.6 se preparan fácilmente combinando una parte de agua destilada con una parte de proporciones diferentes de solución 0.2 M de fosfato sódico dibásico y solución 0.2 M de fosfato sódico monobásico.

Algunos investigadores cuidan de la osmolaridad de todas las soluciones salinas. Algunas fórmulas contienen además de los fosfatos un poco de cloruro de sodio y finalmente glucosa hasta obtener la osmolaridad de niveles fisiológicos.

La solución 0.2 M de fosfato sódico dibásico se prepara añadiendo una sola de las siguientes sales a 1000 ml de agua destilada:

Na ₂ HPO ₄	28.38 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	35.61 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	53.65 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	71.64 g

La solución 0.2 M de fosfato sódico monobásico se prepara añadiendo una sola de las siguientes sales a (cuanto baste para) 1000 ml de agua destilada:

NaH ₂ HPO ₄ .H ₂ O	27.60 g
NaH ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	31.21 g

Para obtener soluciones amortiguadas 0.1 M a diferentes pH (a 25 °C) se mezclan las

⁷ Puede cambiarse por 3.01 gramos de NaH₂PO₄.H₂O

proporciones siguientes y se añaden 50 ml de agua destilada:

pH	solución de Na_2HPO_4	solución de NaH_2PO_4
7.0	30.5 ml	19.5 ml
7.2	36.0 ml	14.0 ml
7.4	40.5 ml	9.5 ml
7.6	44.0 ml	6.0 ml

Solución de Hartman (lactato de Ringer)

Tiene una composición similar al líquido extracelular, por lo que se utiliza como líquido de reemplazo general en la terapia electrolítica a animales, especialmente en casos de acidosis metabólica. Es importante recordar que las soluciones administradas parenteralmente deben estar estériles (*véase la página 214*).

NaCl	3.0 g
KCl	0.4 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.2 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.2 g
Lactato de sodio	3.0 g
Agua destilada.....	cbp 1L

El anión lactato ($C_3H_5O_3^-$) es convertido en bicarbonato (HCO_3^-) por el organismo y produce una concentración de ión bicarbonato similar a la del líquido extracelular.

Solución de Holmes (pH 9)

La solución de Holmes a pH 9 se utiliza para preservar los tejidos que contienen cristales de uratos y oxalatos para ser observados en histopatología (*véase la página 63*). Se preparan soluciones madre de ácido bórico⁸ y tetraborato de sodio⁹:

Solución de ácido bórico 5/M

Ácido bórico.....	12 g
Agua destilada.....	1 L

Solución de tetraborato 20/M

Tetraborato de sodio	19 g
Agua destilada	1 L

Las soluciones madre se mantienen indefinidamente en refrigeración. Para preparar la solución de Holmes se mezclan 20 ml de solución de ácido bórico y 80 ml de solución de tetraborato

SOLUCIONES FIJADORAS

Un fijador se define como una sustancia que conserva después de la muerte la apariencia, estructura, relación y composición química del tejido y las células. Esto es debido a que la estructura de los elementos proteicos de las células son estabilizados por los fijadores.

La preservación debe ser tal, que el tejido fijado se observe casi igual a su estructura en vida.

Un buen fijador debe llenar la mayoría de los siguientes requisitos, ya que es difícil que uno solo posea todas estas cualidades:

- Inhibir la invasión bacteriana y autólisis.
- Penetrar al tejido y células rápidamente.
- Matar a la célula lo más pronto posible, para obtener el mínimo de distorsión.
- Endurecer el tejido y volverlo resistente a posteriores tratamientos.
- Volver insolubles las sustancias celulares y conservar la forma y arquitectura de células y tejidos.
- Permitir en un futuro la aplicación de numerosas técnicas tintoriales, para observar adecuadamente los constituyentes celulares.

Estas características pueden obtenerse al mezclar dos o más fijadores simples, como en el caso del fijador de Bouin.

El fijador más comúnmente empleado en histopatología de tejidos de mamíferos es la **formalina al 10%** en solución amortiguada de fosfatos (*véase la página 59*).

Debido a las restricciones ecológicas en la eliminación de desechos químicos de laboratorios, los fijadores a base de formaldehído (CH_2O) tienden a ser reemplazados por mezclas fijadoras comerciales sin formaldehído.

⁸ H_3BO_3 ; peso molecular = 61.83

⁹ Bórax, $Na_2B_4O_7$; peso molecular = 381.4

- En general, la relación que debe guardarse al sumergir el tejido en el fijador es de **una parte de tejido por 20 partes de fijador**.
- El tiempo de fijación varía de acuerdo al tipo de tejido y la solución fijadora empleada, desde unas pocas horas a días.

Fijadores para conservación de antígenos y ácidos nucleicos

Para inmunohistoquímica (*página 87*) se recomienda fijar las muestras en solución de paraformaldehído al 2% , mientras que para biología molecular (hibridación y *PCR in situ*; *página 92*) se puede utilizar paraformaldehído al 4% , en ambos casos disuelto en amortiguador de fosfatos (*PBS*).

Fijador de Bouin

El líquido fijador de Bouin es un excelente fijador para tejidos blandos. Es particularmente útil para fijar muestras de aparato reproductor, especialmente testículo. También se emplea para sistema nervioso central, médula ósea, y, por su gran capacidad de coagular proteínas, en tejidos con edema severo. Otro uso característico de este fijador es en la demostración de cuerpos de inclusión virales intracelulares (*véase la página 158 del capítulo sobre enfermedades virales*). Por su rapidez se emplea como fijador rutinario en algunos laboratorios, pues permite incluir las piezas el mismo día de la necropsia.

Las características indeseables de este fijador son su costo, su tendencia a lisar eritrocitos y su propensión a formar hematina ácida, por lo que debe evitarse su empleo en tejidos con hemorragias o congestión. No debe emplearse para fijar cortes de riñón.

El ácido pícrico, que es uno de sus ingredientes, es explosivo, por lo que debe conservarse hidratado. Esto tiene como consecuencia algunas restricciones para su venta al público. La fórmula del líquido fijador de Bouin es:

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	750 ml
Formalina (como viene de la botella)	250 ml
Ácido acético glacial ...	de 25 a 50 ml

En el laboratorio de Fisiopatología del CENID Microbiología se preparan garrafones de líquido de Bouin con 2.5% de ácido acético glacial. Después de un mes se le agrega otro 2.5% de ácido acético sólo al volumen de fijador que se va a utilizar de inmediato.

- Este fijador es muy fuerte; el tiempo de fijado oscila entre 4 y 48 horas, y depende sobre todo del grosor de la pieza y de la temperatura.
- Las piezas fijadas tienen un color amarillo al seccionarlas.
- El ácido pícrico debe ser removido antes de procesar los tejidos, por lo que se enjuagan en etanol al 50 -70 % por 4 - 24 horas.
- Se pueden conservar por tiempo indefinido en etanol 70%, o pasar a formalina al 10%.
- Si las muestras se conservan en líquido de Bouin por demasiado tiempo se endurecen y dificultan el corte de los bloques; además, se pierde afinidad por la hematoxilina, por lo que las laminillas no quedan teñidas en forma adecuada.

Fijador rápido de sublimado de mercurio

El cloruro de mercurio se utilizaba frecuentemente en fijadores (Zenker, Susa, fijador rápido) para sistema nervioso central, especialmente en los casos de rabia, pues permite distinguir los cuerpos de Negri con la tinción de Mann (*véase la página 163*). El mercurio es muy tóxico y el fijador usado debe tratarse con solución de tioacetamida al 13% para que precipite y evitar arrojarlo al drenaje (Prophet *et al*, 1995).

Para preparar el fijador se mezclan partes iguales de ácido acético glacial, acetona y solución saturada (disolver a 37 °C) de cloruro mercuríco en etanol absoluto. Esta mezcla

se conserva muy bien. Los tejidos de 3 mm de grosor se fijan por 15 a 30 minutos; después se elimina el sublimado de mercurio con lugol¹⁰ o etanol yodado, para deshidratar, incluir en parafina y teñir con la técnica de Mann (*véase la página 163*).

Fijador de sublimado - formalina

Un 10% de formalina añadida a una solución acuosa saturada de cloruro de mercurio es la composición de este fijador que ha sido empleado en inmunohistoquímica (*página 87*). Tiene dos grandes desventajas:

- I. El mercurio es un metal pesado tóxico.
- I. Se requiere que se eliminen los cristales de cloruro de mercurio que se depositan en los tejidos fijados antes de que sean procesados para inmunohistoquímica:
 - ◇ Se desparafinan los cortes.
 - ◇ Se hidratan.
 - ◇ Se tratan con una solución de yodo al 0.5 en etanol de 70% de 3 a 5 minutos.
 - ◇ Se enjuagan en agua corriente.
 - ◇ Se tratan con solución de tiosulfato de sodio al 2.5% hasta que pierda el color (aproximadamente un minuto).
 - ◇ Se enjuagan en agua por dos minutos.
 - ◇ Se procesan para inmunoperoxidasa.

Fijador de Susa para rabia

El fijador de Susa también se emplea para tejido nervioso en casos de rabia. Se utilizan las siguientes soluciones:

Líquido fijador de Susa, solución A

sublimado de mercurio (HgCl ₂)...	45 g
cloruro de sodio	5 g
agua destilada	800 ml

- Esta mezcla es estable, se conserva indefinidamente.

Líquido fijador de Susa, solución B

formalina	200 ml
ácido acético	40 ml
ácido tricloroacético	20 g

- Esta solución se prepara antes de usar.

Para preparar la solución fijadora de Susa se mezclan 80 ml de la solución A con 25 ml de la solución B.

Se ponen a fijar los cortes de cerebro de aproximadamente 5 mm de espesor durante 2 horas; cuando se completa la fijación las piezas se pasan directamente a etanol yodado, luego a etanol del 96 y por último a etanol absoluto, para incluir en parafina.

Fijador de Zenker

Es ideal para fijar pequeñas piezas de hígado y bazo. El tiempo requerido de fijación es de 12 a 24 horas. Este fijador permite una excelente tinción posterior del núcleo celular y fibras conectivas, por lo que se recomienda cuando se desean realizar tinciones tricrómicas.

Una desventaja que tiene es la penetración pobre en el tejido, por lo que los tejidos a fijar no deben exceder a 0.5 cm de grueso; después de la fijación el tejido debe lavarse con agua corriente por varias horas y no se deben conservar las piezas fijadas en esta solución. No se recomienda su uso en secciones congeladas.

Cloruro de mercurio.....	5.0 g
Dicromato de potasio	2.5 g
Sulfato de sodio (opcional).....	1.0 g
Agua destilada	1000 ml

Añada 5 ml de ácido acético glacial antes de usarlo. Este fijador no se conserva bien después de añadir el ácido, por lo que se prepara y almacena con los primeros cuatro ingredientes.

Solución fijadora de Karnowsky

Se utiliza para fijar pequeños trozos de tejido (1 mm de grosor) para microscopía electrónica. Para preparar 100 ml de solución fijadora

¹⁰ Un g de yodo + 2 g de yoduro potásico + 100 ml de agua destilada.

de Karnowsky ¹¹ se utiliza una campana de extracción para gases tóxicos y se procede de la siguiente manera:

- Disolver 2 g de paraformaldehído en 80 ml de agua destilada a 65 °C.
- Añadir lentamente pocas gotas de solución hidróxido de sodio 1 N, hasta que se aclare el color lechoso de la solución.
- Enfriar a 4 °C.
- Añadir 2.51 g de Na₂HPO₄·12H₂O y 0.41 g KH₂PO₄
- Añadir 12 ml de glutaraldehído al 25 %.
- Añadir agua destilada, cbp 100 ml.
- Guardar en refrigeración a 4 °C.

Solución fijadora de Davidson

Se utiliza para fijar peces, camarones, langostinos y otros crustáceos. Para preparar un litro de solución fijadora de Davidson se utilizan:

Etanol 95%.....	330 ml
Formalina	220 ml
Ácido acético glacial.....	115 ml
Agua destilada.....	335 ml

Soluciones fijadoras de Klotz y de Jores

Se usan en la conservación de piezas para museo y también para almacenar en refrigeración las piezas de necropsias por unos días, para posteriormente discutirlos en sesión o fotografiarlas. Tienen la ventaja de que conservan el color original de los tejidos, pero sólo penetran de uno a tres mm, por lo que la muestra queda inadecuadamente fijada para histopatología; por lo que conviene cortar un trozo pequeño de la muestra para fijarlo con la técnica usual.

La desventaja de esta fórmula es que los colores rojo y rosa (como en pulmón) cambian rápidamente a un rojo claro uniforme, perdiéndose las diferencias sutiles de color.

¹¹ Con 2% formaldehído y 3% glutaraldehído, disueltos en solución amortiguada de fosfatos 0.1 M (*página 45*).

Se enlistan las fórmulas descritas por McGavin & Thompson (1988):

Klotz y Kaiserling (1946)

Cloruro de sodio	7 g
Bicarbonato de sodio	4 g
Hidrato de cloral	31.2 g
Formalina (37%).....	25.6 ml
Sulfato de magnesio.....	20 g
Agua.....	cbp 1000 ml

La fórmula de Klotz y Kaiserling arriba descrita tiene los inconvenientes del alto costo y la restricción en la venta del hidrato de cloral ¹².

Jores (Ludwig, 1979)

Cloruro de sodio	10 g
Sulfato de sodio anhidro	20 g
Formalina (37%).....	20 - 40 ml
Sulfato de magnesio.....	20 g
Agua.....	cbp 1000 ml

La fórmula de Jores arriba descrita es más económica y fácil de preparar. Para conservar las piezas hasta por una semana se procede a:

- Lavar los órganos en solución salina isotónica (*página 45*) para evitar hemólisis; o en agua, para limpiar el exceso de sangre.
- Se colocan en solución de Jores en la proporción de un kg de muestra por diez litros de solución.
- Se guardan en refrigeración a 4 °C por 24 a 48 horas.
- Se cambian a solución fresca de Jores en proporción de un litro por cada kilogramo de muestra.
- Se guardan en refrigeración a 4 °C hasta su presentación o fotografía.

Fijación de piezas para museo

Para incluir órganos en frascos o cajas de acrílico para su exhibición en museo se preparan dos reactivos por separado:

¹² El hidrato de cloral se clasifica como droga narcótica en muchos países y se requiere un permiso especial para su compra.

Klotz 1

Sulfato de sodio.....	385 g
Bicarbonato de sodio.....	351 g
Cloruro de sodio.....	317 g
Nitrato de potasio.....	657 g
Sulfato de potasio.....	45 g
Hidrato de cloral.....	1750 g
Formalina.....	1750 ml
Agua destilada.....	35 L

Klotz 2

Sulfato de sodio.....	193 g
Bicarbonato de sodio.....	175 g
Cloruro de sodio.....	159 g
Nitrato de potasio.....	328 g
Sulfato de potasio.....	23 g
Hidrato de cloral.....	350 g
Formalina.....	175 ml
Agua destilada.....	35 L

1. Se fija la pieza durante uno a cinco días en la solución Klotz 1.
2. Se lava en agua corriente durante 24 horas.
3. Se deja en la solución de Klotz 2 durante varios días o semanas o hasta que la solución quede transparente.
4. Se monta en solución de Klotz 2 fresca en un recipiente adecuado.

Alcohol - éter

Se usa en la fijación de frotis e improntas en citología. Es especialmente útil cuando se va a utilizar la tinción de Papanicolau. Es altamente flamable.

Alcohol etílico absoluto.....	1 parte
Éter.....	1 parte

- Fije el frotis por 15 minutos o más.
- Enjuague en alcohol.
- Enjuague con agua destilada.
- Proceda a teñir.

**SOLUCIÓN LIMPIADORA
(MEZCLA CRÓMICA)**

La mezcla crómica se utiliza para limpiar el material de cristalería; es muy corrosiva y debe evitarse el contacto con piel y mucosas. Al prepararla debe recordarse que cuando se mezclan agua y ácido sulfúrico se libera calor, por lo que el ácido debe agregarse lentamente al recipiente con el agua:

Dicromato de potasio.....	60 g
Ác. Sulfúrico concentrado.....	300 ml
Agua destilada.....	460 ml

Debe disolverse el dicromato de potasio en agua fría y después **agregar lentamente el ácido sulfúrico, usando un matraz en charola con hielos.**

LECTURAS RECOMENDADAS

- Baker, F. J.: *Introduction to medical laboratory technology*. 5th edition. Butterworths. London, 1978.
- Fuentes, H. V. O.: *Farmacología y Terapéuticas Veterinaria*. 2^a edición. Ed. Interamericana McGraw-Hill. México, 1992.
- Fuentes, H. V. O.: *Fisicoquímica para Veterinarios*. Interamericana. México, 1987.
- Humason, G. L.: *Animal Tissue Techniques*. Freeman, San Francisco, U. S. A, 1979.
- McGavin, M.D. & Thompson, S. W. *Specimen dissection and Photography*. Charles C. Thomas, Springfield, U. S. A, 1988.
- Morilla, G. A.: *Manual de inmunología*. Diana. México, 1986.
- Smoot, R. C.: *Química. Un curso moderno*. Cia. Editorial Continental S. A., México, 1984.

Uso del microscopio óptico

Germán Valero Elizondo

Partes del microscopio compuesto

Identificación y solución de algunos problemas comunes

- Problemas eléctricos
- Problemas mecánicos
 - Alineación del eje óptico
- Problemas ópticos
 - Limpieza de las lentes

Uso habitual del microscopio

- Iluminación de Köhler
- Contraste de fases
- Iluminación de campo oscuro
- Campo oscuro hechizo (iluminación parcial de Rheinberg)
- Observación con luz polarizada
- Observación de fluorescencia

Fotografía a través del microscopio

Lecturas recomendadas

PARTES DEL MICROSCOPIO COMPUESTO

Objetivos

Los que se seleccionan en un revolver. Suelen ser secos, excepto los de grandes aumentos que suelen ser de inmersión en aceite. Los hay también con diafragma iris (para campo oscuro) y de contraste de fases (para observar muestras poco contrastantes o sin teñir). Según el grado de corrección pueden ser acromáticos o apocromáticos, de campo plano o esférico. Las lentes objetivos tienen marcados en su

cuerpo el aumento del objetivo seguido de una diagonal y la apertura numérica del objetivo. Además tienen descrita la longitud mecánica del tubo en mm (o el signo ∞ de infinito). Los objetivos secos fuertes suelen tener indicado el grosor (en mm) del cubreobjetos que debe usarse (de 0.13 a 0.17 mm, equivalentes al número 1 de cubreobjetos *standard*, a 0.27 mm equivalentes al número 2).

Oculares

Por donde se observa la imagen. Pueden ser del tipo antiguo (Huygen) o de campo amplio; también los hay para usuarios que requieren anteojos para corregir astigmatismo y enfocables para microscopios múltiples o fotomicroscopios. Los oculares pueden tener diverso grado de corrección (C) o compensación (*Kompens*) para contrarrestar las aberraciones de las lentes objetivos. En los oculares aparece grabado el diámetro de aumento seguido de una diagonal y la cifra de campo (p.ej. 10x/20, 12.5x/16, 20x/10). El diámetro del campo visual observable en un microscopio se calcula dividiendo la cifra de campo del ocular entre el aumento del objetivo.

Platina

Donde se coloca la muestra.

Lámpara

Usualmente alojada en una caja con espejo cóncavo (con tornillos para centrado) y una lente colector del haz de luz inmediatamente junto al foco. Esta lente puede tener un mecanismo para aproximarla o alejarla al foco (enfocar). En algunos casos existe un selector para varios arreglos de lentes colectores que optimizan la iluminación para objetivos de bajo, medio y alto poder de amplificación (*Low, Medium, High*).

Condensador

Tiene una lente frontal (lente principal) y un diafragma de condensador. La lente frontal puede ser abatible, o bien, puede haber una

lente auxiliar bajo el condensador, para poder iluminar todo el campo visible con objetivos panorámicos. Los hay de larga distancia de trabajo (para microscopios invertidos), de campo oscuro y de contraste de fases. También hay ultracondensadores con revólver de lentes para usarlos en campo claro, campo oscuro y contraste de fases.

Filtros

Pueden ser:

Filtros excitadores (entre el foco y la muestra):

- Azules para corrección de la temperatura de color. Permiten tomar fotografías en color con película para luz de día, cuando la luz empleada es de tungsteno.
- Difusores (vidrio esmerilado) para uniformizar la iluminación.
- Verde para observaciones críticas y fotografía en blanco y negro.
- Grises neutros para reducir la luminosidad en fotografía a color.
- Azules y violetas para fluorescencia (*véase la página 56*).
- Supresor de infrarrojo para evitar calentamiento de la muestra o daño al observador.
- Polarizado rotatorio, para observación de materiales anisotrópicos como los cristales de uratos, oxalatos, sílice y sulfas (*véase la página 56*).
- De didymium para fotomicrografías de muestras teñidas con eosina usando película *kodachrome* y *ektachrome*.

Filtros barrera (entre la muestra y el ocular).

- Para absorber luz ultravioleta (fluorescencia).
- Polarizado fijo.

IDENTIFICACIÓN Y SOLUCIÓN DE ALGUNOS PROBLEMAS COMUNES

Para obtener el mejor rendimiento de un microscopio, es necesario que funcionen correc-

tamente todas sus partes eléctricas, mecánicas y ópticas.

Problemas eléctricos

En algunos laboratorios es frecuente que la tensión de la red eléctrica fluctúe. La cantidad de luz producida por los focos incandescentes (de tungsteno) de la mayoría de las lámparas de microscopio está en relación con el voltaje que reciben; a mayor voltaje mayor luminosidad y mayor temperatura de color¹³. Esta situación resulta particularmente importante en la fotomicrografía y en microscopios de fluorescencia. La solución a este problema es emplear un regulador de voltaje casero o industrial, revisando que el amperaje sea apropiado para el equipo. En el caso de las lámparas de mercurio, la luz es producida por un arco eléctrico dentro de la lámpara, y es muy importante que se utilice el voltaje adecuado y se sigan las indicaciones de operación recomendadas por el fabricante para evitar que estallen dichas lámparas.

Problemas mecánicos

En equipos de uso poco frecuente, la acumulación de polvo y resequeadad del lubricante en aquellos microscopios que lo requieren causa que se “endurezcan” los controles, dificultando el enfoque y movimiento de la platina mecánica. La solución es una limpieza y lubricación (según el equipo) concienzudas. El limpiador a usar puede ser tan leve como un lienzo de algodón levemente humedecido, que no suelte pelusa, o tan severo como el lavar las piezas desarmadas en un disolvente.

Los disolventes van desde el alcohol isopropílico¹⁴ hasta el xileno (xilol). Debe tenerse cuidado al usar disolventes, pues muchos microscopios tienen piezas de plástico, o bien,

¹³ La temperatura de color de los focos de tungsteno **halógeno** para fotomicrografía suele ser de 3200 grados Kelvin, pero los focos de tungsteno simple son de 2800 a 3000 grados Kelvin y la luz solar tiene 5500 grados Kelvin.

¹⁴ Que se prefiere al alcohol etílico o de caña.

cubiertas con pintura sensible al xileno, y podría dañarse seriamente la apariencia y funcionamiento del microscopio.

Los lubricantes pueden ser: aerosol de silicón¹⁵, aceite ligero¹⁶, lubricante sintético con teflón¹⁷, aceite automotriz multigrado 10W50, grasa de silicón¹⁸, grasa amarilla, o grasa grafitada. En algunos casos, puede resultar útil el emplear kerosene (petróleo diáfano) como disolvente - lubricante. Conviene recordar que algunos microscopios de reciente fabricación (p.ej: *Zeiss* modernos) fueron diseñados de tal forma que no requieren lubricación alguna, pues las piezas móviles no tienen holgura suficiente para la capa de lubricante. El lubricar estos equipos puede ser contraproducente al aumentar el desgaste de las piezas móviles.

Alineación del eje óptico

Por razones obvias, es necesario que todos los componentes por donde pasa el haz de luz y la imagen estén alineados unos con otros. En caso contrario, debe alinearse primero la fuente de luz por separado y después todos los componentes por debajo de la platina. Los componentes por arriba de la platina generalmente requerirán alineación sólo en algunos casos como en los microscopios multi-usuarios con varias cabezas, los microscopios invertidos (con objetivos por debajo de la platina), las cámaras de fotografía o vídeo y los equipos de epi-iluminación (epi-fluorescencia).

La alineación correcta de un microscopio complejo requiere de un aparato especial (colimador) y personal calificado.

La alineación de la lámpara sólo es necesaria cuando se cambia un foco fundido (evitando el dejar huellas digitales en el foco, pues acortan su vida útil). Para alinear (el foco dentro de) una lámpara de microscopio removable (p.ej: *Zeiss*), se puede encender a poco voltaje si es de tungsteno, se proyectará la ima-

gen del filamento sobre una superficie perpendicular al haz luminoso y se enfocará la lente colector hasta tener una imagen nítida del filamento (o del arco de las lámparas de mercurio). Al mismo tiempo que se observa la imagen del filamento proyectada, se moverá el tornillo de ajuste que acerca o aleja al reflector del foco, hasta que la imagen del filamento esté en el mismo plano focal que la imagen de su reflejo. Hecho esto, se moverán los tornillos de ajuste horizontal y vertical hasta que se superpongan estas dos imágenes. Si la lámpara ha sido alineada correctamente, proyectará una imagen nítida simultánea del filamento y su reflejo sobrepuesto.

Para alinear el haz de luz cuando el foco está integrado al cuerpo del microscopio, puede ser útil el poner provisionalmente una hoja de papel cebolla sobre la platina, para poder ver como se mueve el haz de luz mientras se ajustan los tornillos de centrado (o se mueve todo el conjunto) del foco. Cuando el equipo está al menos parcialmente alineado, se puede quitar dicho papel y al remover temporalmente una lente ocular, es posible observar la imagen del filamento directamente al asomarse por el tubo del microscopio, y de esta forma se puede lograr un excelente alineamiento empírico.

En las lámparas de mercurio es muy importante seguir fielmente las indicaciones del fabricante para el montaje y su operación, ya que pueden estallar si son usadas en forma incorrecta.

En los microscopios multi-usuarios, es posible que al cambiar de un objetivo a otro, el observador tenga la impresión de que se mueve el área de observación; dejando de coincidir el campo visual del objetivo panorámico con el del seco fuerte o el de inmersión. Esto es debido a que los componentes que soportan los cabezales multi-usuarios están desalineados con respecto del eje óptico del cuerpo del microscopio. Esto usualmente es causado por un ajuste incorrecto de la altura del brazo (o brazos) que soporta

¹⁵ Del usado para sintonizadores de TV antiguos: *Silijet E-plus*. Silimex, México.

¹⁶ *3 en 1*, *Singer*, *Remington*, etc....

¹⁷ *Teflon lubricant*. *Radio Shack*.

¹⁸ Utilizada para lubricar videograbadoras.

los cabezales auxiliares, o bien, a una mesa de superficie irregular. Una vez identificado el problema, la solución consiste en regular la altura de los brazos hasta que todos los usuarios observen la misma imagen.

Problemas ópticos

La queja más frecuente con los microscopios es la pobre definición causada por suciedad de las lentes, usualmente la parte distal de los objetivos. Un caso tristemente común es el del objetivo de inmersión que es dejado con aceite por varios días, semanas, meses, años...

A manera de referencia, debe recordarse que las partículas de polvo depositadas sobre las lentes causan poca degradación de la imagen, a diferencia de las huellas digitales, las manchas de aceite o grasa, y las rayaduras o raspaduras de las lentes, que degradan sensiblemente la imagen.

Debe recordarse que las huellas digitales y rayaduras en la lente condensadora también degradan la imagen.

Limpieza de las lentes

Una mezcla útil para limpiar lentes es:

acetona	30%
éter etílico	30%
etanol	30%
agua destilada	10%.

Si la suciedad pudiera removerse con la aplicación de aire comprimido (limpio), ésta sería la mejor opción. De lo contrario, se prefiere una limpieza húmeda a una limpieza seca, pues el arrastrar partículas sobre la superficie de una lente seca es un procedimiento abrasivo, que debe evitarse.

El algodón que se usa para limpiar lentes debe desecharse después de una aplicación. El manejo del algodón en hisopos o torundas va dirigido a evitar que la grasa y partículas presentes en los dedos del que limpia sean depositadas en la lente que supuestamente es limpiada.

USO HABITUAL DEL MICROSCOPIO

Iluminación de Köhler

En estudios de microscopía de campo claro (técnica usual), se intentará obtener la máxima resolución del microscopio, con un nivel de luminosidad adecuado para el ojo del observador y con una iluminación uniforme de todo el campo visual del sujeto. Esto se logra arreglando la posición de la lámpara, la lente colectora, diafragma de campo, diafragma del condensador, la lente condensador y la lente auxiliar bajo el condensador. El principio de la técnica de iluminación de Köhler es: enfocar la lente colectora del foco sobre la muestra, para poder tener una iluminación uniforme a pesar de la geometría irregular del propio filamento del foco. Simultáneamente, la imagen del filamento del foco aparecerá enfocada en el diafragma del condensador, y en el diafragma de salida del objetivo.

Una forma sencilla de lograr un rápido arreglo satisfactorio es con el siguiente algoritmo:

1. Seleccionar un objetivo de 10x o 20x.
2. Enfocar provisionalmente una laminilla con imagen típica (laminilla de hígado normal teñido con Hematoxilina Eosina).
3. Cerrar cuanto sea posible el diafragma de campo.
4. Bajar todo su recorrido el condensador.
5. Abrir todo el diafragma del condensador.
6. Subir paulatinamente el condensador mientras se observa la imagen de la muestra.
7. Cuando se vea nítidamente la silueta del diafragma de campo iluminando la muestra, dejar a esa altura el condensador.
8. Abrir el diafragma de campo a que ilumine la totalidad del campo visual.

9. Centrar (de ser necesario) el haz de luz con los (2 usualmente) tornillos a ambos lados del condensador o en la base del microscopio.
10. Cerrar paulatinamente el diafragma del condensador mientras se observa el sujeto.
11. Al notar la mínima disminución de luminosidad, dejar en esa posición dicho diafragma.

En condiciones rutinarias, el diafragma de campo se ajusta para iluminar todo el campo visual cuando se usa el objetivo de menor aumento (excepto panorámicos y lupas), mientras que el diafragma del condensador se suele ajustar para proporcionar la apertura del objetivo de mayor aumento (excepto lentes de inmersión).

Algunos microscopios permiten seleccionar el tipo de lente colector de la lámpara mediante una palanca marcada L-M-H, lo que resulta en que el haz de luz se concentre poco, medianamente o mucho, obteniéndose la mayor cantidad de luz en la superficie de observación en todos los casos.

Para observaciones muy definidas empleando objetivos con apertura numérica superior a 1, se requerirá el empleo de aceite de inmersión por arriba y por debajo de la laminilla (entre el objetivo y la laminilla y entre la laminilla y el condensador).

Contraste de fases

La observación en microscopía de contraste de fases es muy útil para muestras no teñidas, tales como improntas de lesiones y el conteo de células somáticas en leche (*véase la página 118*). Se requiere que tanto el objetivo como el condensador sean diseñados para tal fin y estén pareados; esto suele aparecer como una indicación Ph1, Ph2... La posición o altura de dicho condensador con respecto a la laminilla, y su centrado son críticos para obtener una iluminación eficiente. Los condensadores especiales para contraste de fases y campo oscuro

suelen tener un segundo juego de tornillos de centrado, los que deben ajustarse (haciendo coincidir los aros o máscaras de fase) adecuadamente para que funcionen estos métodos. Para comprobar el correcto centrado de los arillos de fase, se puede remover temporalmente uno de los oculares; al mirar por el tubo donde se quitó el ocular se podrá observar el diafragma de salida de la lente objetivo, donde se verá fácilmente si coinciden los arillos de fase. El centrado de los arillos de fase se facilita si se emplea un telescopio auxiliar para magnificar la imagen de dichos arillos.

Iluminación de campo oscuro

Esta es una técnica muy útil para observar la presencia de microorganismos en muestras biológicas. Particularmente, permite la observación directa de leptospiras vivas (*véase el capítulo correspondiente en la página 140*), bacterias y protozoarios en líquido abomasal de fetos abortados (*véase la página 24*), líquido cefalorraquídeo de casos de meningitis y contenido intestinal de diarreas bacterianas y por protozoarios. Para realizar observaciones en campo oscuro se requiere de un condensador especial; la mayoría de dichos condensadores suelen requerir el empleo de aceite de inmersión entre la lente frontal y la laminilla. La posición o altura de dicho condensador con respecto a la laminilla y su centrado son críticos para obtener una iluminación eficiente. En la observación en campo oscuro, resulta particularmente difícil el empleo de objetivos de gran aumento (mayores de 40x), y en ocasiones se requerirá un condensador de inmersión en aceite y un objetivo con diafragma iris ajustable para poder hacer observaciones de campo oscuro a grandes aumentos.

Campo oscuro hechizo (Iluminación parcial de Rheinberg)

En muchos casos, es posible lograr un efecto de iluminación en campo oscuro en un microscopio estándar, al colocar una pieza que bloquee el centro del haz de luz dentro del

propio condensador, a la altura del diafragma (*Figura 1*).

Figura 1. Iluminación parcial de Rheinberg.

La selección del tamaño del círculo central que bloquea la luz es muy importante; un tamaño muy pequeño no alcanza a producir el efecto de campo oscuro para el objetivo dado; un tamaño muy grande deja pasar muy poca luz y es poco eficiente.

Observación con luz polarizada

Esta es una técnica frecuentemente empleada para identificar partículas cristalinas en cortes microscópicos, como los oxalatos en riñones, y para observar el amiloide coloreado con rojo congo. Se requieren dos filtros polarizados, uno entre el foco y la muestra, y otro entre la muestra y el ocular; al menos uno de estos filtros debe de poderse rotar, para observar materiales anisotrópicos, los cuales brillan cuando ambos filtros están a 90 grados con respecto a sus fases, y el resto del campo se oscurece considerablemente.

Es relativamente fácil colocar un filtro polarizado¹⁹ en el interior del cuerpo de un microscopio, entre las lentes objetivo y las

oculares, para que sirva como filtro fijo; mientras que el otro filtro polarizado, que se coloca sobre el diafragma de campo, puede rotarse al tiempo que se observa la imagen.

Un arreglo alterno requiere que el usuario use anteojos polarizados y gire un filtro polarizado colocado sobre el diafragma de campo.

Observación de fluorescencia

Esta técnica es usada para la demostración de anticuerpos marcados con un colorante que emite luz visible al ser excitado por luz de longitud de onda menor. Los colorantes fluorescentes usuales son la fluoresceína, rhodamina, auramina O, rojo Texas, amarillo Lucifer, ... También se pueden observar por este método los depósitos de tetraciclinas²⁰ en hueso, y algunas colonias de hongos (p. ej.: *Aspergillus* spp.) y sus metabolitos (aflatoxinas). Es muy importante que los equipos de fluorescencia estén en perfectas condiciones, especialmente los filtros barrera que deben absorber el espectro ultravioleta que se dirige al observador, para evitar lesiones serias en la retina.

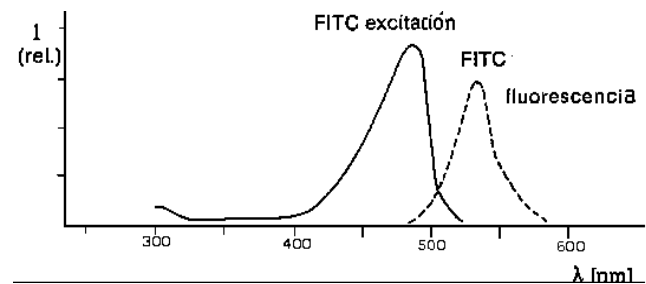


Figura 2. Espectros de absorción y emisión del isotiocianato de fluoresceína.

La selección de los filtros es muy importante, pues la eficiencia (brillantez) de la fluorescencia depende de la cantidad de energía que alcanza a excitar al fluorocromo y la proporción de luz emitida que es captada por el observador. No sólo es importante cuales longitudes de onda son transmitidas y cuales

¹⁹ Que se adquiere en una tienda de artículos fotográficos.

²⁰ Cada tetraciclina emite una fluorescencia diferente.

son absorbidas, sino la proporción en que esto sucede. No es raro encontrar que los juegos de filtros para fluorescencia de alta eficiencia sean 10 veces más caros que los filtros antiguos convencionales. Sin embargo, con el uso continuo del microscopio se observara que el alto costo de las lámparas de mercurio que requieren los equipos antiguos sobrepasa con creces el moderado costo de los focos de tungsteno halógeno que usan los equipos modernos, y esto compensa la inversión inicial mayor de los filtros de alta eficiencia.

inexpensive equipment. *Scientific American* 240 (1):126-131, 1979.

FOTOGRAFÍA A TRAVÉS DEL MICROSCOPIO

La fotografía a través del microscopio se describe en el libro “*Fotografía Médica*” de G. Valero y G. Valero (1997), editado por la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A. C.²¹

LECTURAS RECOMENDADAS

Las siguientes referencias pueden servirle al lector interesado en ampliar la información sobre uso de microscopios ópticos:

Anónimo: *Function, Use and Maintenance of Routine Microscopes*. Zeiss, West Germany, 1986.

Rincón, A. R. y Reyes, N.: *Manual de microscopía óptica*. Asociación de químicos del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México, 1992.

Smith, R. F.: *Microscopy and Photomicrography: a working manual*. CRC Press, U.S.A., 1994.

Valero, G. y Valero, G.: *Fotografía Médica*. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C., México, D.F, 1997.

Walker, J.: *The amateur scientist: How to make dazzling photomicrographs with simple and*

²¹ Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Ciudad Universitaria, México D.F. 04510. Teléfono / FAX (52) (5) 616 10 60; (52) (5) 622 58 88. Correo electrónico: yema@servidor.unam.mx ; gvalero@servidor.unam.mx

Histopatología

Germán Valero Elizondo
Guillermo Valero Elizondo
Francisco Morales Alvarez

Introducción

Toma de muestras

- Necesidad del muestreo
- Elección del órgano a muestrear
- Elección de la zona a muestrear
- Obtención correcta de la pieza
- Autólisis

Fijación de muestras

- Tiempos y temperaturas de fijación
- Precauciones al emplear formaldehído
- Formalina amortiguada con fosfatos

Descalcificación

- Descalcificación de lesiones tuberculosas

Corte en criostato

Inclusión en parafina

Proceso de tejidos con cristales hidrosolubles

Corte con microtomo

Montaje en laminillas

Coloración H.E.

- Preparación de las soluciones
- Hematoxilina de Harris
- Eosina alcohólica
- Rutina de tinción H.E.

Algunos detalles importantes

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

La observación de laminillas es una parte muy importante del trabajo de un laboratorio de histopatología, ya sea para fines diagnósticos, investigación o docencia. El procesamiento adecuado de las muestras es requisito para que esta labor tenga la eficiencia esperada. En este capítulo se describen técnicas rutinarias de utilidad comprobada para la mayoría de los ca-

sos. Se mencionan también los errores frecuentes y su corrección. Como en todas las actividades manuales, la experiencia suele traer consigo el mejoramiento de la técnica.

La ley de Murphy sostiene que: “Si algo puede salir mal, saldrá mal”. El procesamiento de laminillas de histopatología no escapa a esta ley, por lo que se sugiere leer en forma minuciosa las técnicas, asegurarse que se han entendido y practicarlas primero en muestras duplicadas, antes de trabajar casos únicos e irremplazables de diagnóstico o investigación.

El proceso rutinario para la elaboración de laminillas de histopatología comprende:

- Obtención de la muestra adecuada.
- Fijación de la muestra.
- Inclusión en parafina²²
- Montaje en bloques de parafina.
- Corte de los bloques de parafina con microtomo.
- Montaje de los cortes a las laminillas.
- Tinción H.E.²³
- Montaje del cubreobjetos.

TOMA DE MUESTRAS

La toma correcta de las muestras es indispensable para obtener buenas laminillas de histopatología; deben considerarse los siguientes aspectos:

Necesidad del muestreo

Sólo deben trabajarse aquellos casos que requieran histopatología para su evaluación o diagnóstico. Si las lesiones macroscópicas y

²² Remoción de fijador, deshidratado en alcoholes, aclarado e impregnado en parafina.

²³ Desparafinado, hidratación, tinción con hematoxilina, enjuague, remoción del exceso de hematoxilina, neutralización de la hematoxilina, enjuague, tinción de contraste con eosina, remoción del exceso de eosina, deshidratación y aclarado.

otros exámenes practicados son suficientes para emitir el diagnóstico deseado, no deben desperdiciarse los recursos en laminillas de histopatología superfluas. Asimismo, si se puede obtener la misma información con una simple impronta coloreada, debe preferirse a la inclusión en parafina.

Elección del órgano a muestrear

Sólo hay que tomar especímenes de los órganos necesarios para el diagnóstico o la investigación. Debe evitarse el muestreo indiscriminado que produce los llamados *cerdogramas*, *perrogramas*, y demás, que usualmente representan gastos innecesarios de recursos.

Elección de la zona a muestrear

Debe tomarse una pieza representativa del órgano; en caso de lesiones severas, conviene incluir una parte no lesionada dentro de la muestra para poder identificar el órgano al momento de la observación microscópica. Es frecuente encontrar laminillas de histopatología con lesiones claras, pero en las que no se identifica el órgano o tejido original, lo que da lugar al penoso caso de tener que describir un *carcinoma indiferenciado en un órgano indeterminado*.

Obtención correcta de la pieza

Aunque parezca obvio, los instrumentos de corte deben cortar con un excelente filo. Del uso de cuchillos poco afilados o tijeras escolares, resulta la compresión y tracción exagerada de los tejidos, que puede producir artificios indeseables, sobre todo en órganos blandos como testículo, en órganos tubulares como intestino y conducto deferente y en aquellos tejidos que posean glándulas tubulares como el útero.

Autólisis

La destrucción de los organelos celulares es una consecuencia de la muerte celular. Cuando algunas células mueren en un organismo viviente se produce necrosis. Cuando todas las células del organismo mueren se produce la

autólisis. La apariencia microscópica de una célula necrosada y otra autolisada son idénticas; es la distribución de las lesiones y la reacción del organismo lo que nos permite diferenciarlas. Por esto, es muy importante el minimizar la severidad de la autólisis *post-mortem*, para poder reconocer con facilidad las lesiones *antemortem*. Con frecuencia se intenta disminuir la autólisis con refrigeración del cadáver o las muestras.

La autólisis depende del estado nutricional del animal, presencia de piel o grasa aislante, temperatura corporal al momento de la muerte, temperatura ambiental y metabolismo del tejido particular.

FIJACIÓN DE MUESTRAS

Los fijadores preservan la arquitectura celular y tisular, detienen la autólisis, previenen la multiplicación de bacterias y endurecen los tejidos.

La preparación y empleo de las soluciones fijadoras de Bouin, Zenker, Karnowsky, Jores y Klotz se describen en el capítulo “preparación de soluciones” (*véanse las páginas 47 a 49*)

La relación usual entre el peso de la muestra de tejido y el volumen de fijador es de 20 partes a una.

El fijador más común utilizado para bloques de tejidos de vertebrados es el **formaldehído**. El formaldehído es un gas muy irritante (*véase la página 46*) que usualmente se maneja en solución acuosa. La solución de formaldehído al 36% o 40% se conoce como **formalina** o **formol**. Esta solución se toma como si fuera al 100% para todas las diluciones. Las presentaciones de formalina suelen contener metanol y carbonato de calcio como conservadores (que deben dejarse en el frasco), y ácido fórmico como subproducto contaminante. Para fines de fijación de tejidos, la formalina grado reactivo analítico y la formalina industrial o grado técnico son igualmente efectivas, aunque la primera cuesta bastante más que la segunda.

El líquido fijador usual: formalina al 10% en agua (una parte de formalina + 9 partes de agua) o solución salina isotónica o fosfatada, posee una concentración de formaldehído de 3.6 %.

- **El grosor ideal para muestras de tejidos rutinarios es de tres a cinco milímetros.**

Los órganos huecos (aparato digestivo) se pueden ligar e inyectar con fijador, teniendo cuidado de no sobrellenarlos más allá de su volumen habitual.

- Es conveniente enjuagar los órganos con solución salina isotónica o agua, para retirar el exceso de sangre, antes de fijarlos. (*véase McGavin & Thompson, 1988*)
- El pulmón puede requerir la colocación de un trozo de papel o algodón en la superficie para evitar que flote, o puede fijarse por vía traqueal.
- Todos los órganos deben agitarse en forma suave dentro del frasco con fijador para evitar que se adhieran al fondo.

Tiempos y temperaturas de fijación

El tiempo usual de fijado es de 24 a 48 horas.

- El colocar las muestras con fijador en refrigeración a 4 °C disminuye la autólisis y preserva mejor el detalle celular, aunque aumenta el tiempo necesario para la fijación de la muestra hasta tres o cuatro días.
- Las piezas por fijar nunca deben congelarse.
- El colocar las muestras en estufa a 56 °C acelera el proceso de fijación a cerca de cuatro horas, pero a costa de reducir el detalle celular.
- Es posible obtener una fijación ultrarrápida de tejidos con la utilización de un horno de microondas casero.

Precauciones al emplear formaldehído

La exposición a altas temperaturas y el contacto prolongado con cromatos causa la polimerización del formaldehído, que lo inutiliza como fijador de tejidos.

- El formaldehído inhalado o ingerido es muy tóxico e irritante. El contacto de la piel con formaldehído puede causar irritaciones, alergias y neoplasias (*véase la página 46*).
- A pH ácido el formaldehído cambia a ácido fórmico, que puede causar **artificios** de fijación; el más importante es la producción de **hematina ácida** a partir de hemoglobina, por lo que es frecuente que la formalina se disuelva en solución amortiguada de fosfatos (*PBS, véase la página 45*).

Resultan muy interesantes algunas anécdotas sobre el agua “potable” de algunas zonas de la ciudad de México, que por su alto contenido de sales y materia orgánica en suspensión, funciona como una solución amortiguada débil.

En condiciones rutinarias, existe poca diferencia apreciable entre las muestras fijadas con formalina en solución amortiguada con fosfatos (*PBS*), las fijadas con formalina disuelta en solución salina isotónica, y aquellas fijadas con formalina disuelta en agua de la llave. Algunas personas le ponen trozos de gis blanco (sulfato de calcio) a las soluciones de formalina. Otros investigadores le adicionan un poco de rojo de fenol para tener una idea del pH de la solución.

Formalina amortiguada con fosfatos

Para preparar formalina amortiguada se mezcla un litro de agua destilada, cuatro gramos de fosfato ácido de sodio monohidratado, 6.5 gramos de fosfato disódico anhidro y 111 mililitros de formalina.

DESCALCIFICACIÓN

En ocasiones los tejidos tienen depósitos de sales minerales o, como en el caso de huesos y dientes, son demasiado duros para cortarse en el microtomo y deben ser descalcificados antes de incluirlos en parafina. La exposición a soluciones de ácidos o sustancias quelantes disolverá las sales de calcio (carbonatos e hidroxapatita principalmente). Suelen emplearse

20 ml de solución descalcificadora por cada gramo de tejido. Actualmente están disponibles comercialmente diferentes soluciones para descalcificar tejidos, o se puede preparar alguna de las siguientes:

- Solución de ácido etilén diamino tetraacético (*EDTA*) al 20% en solución amortiguada de fosfatos 0.1 M a pH 7.2 (*véase la página 45 del capítulo sobre preparación de soluciones*)
- Solución de ácido etilén diamino tetraacético (*EDTA*) al 5% en solución amortiguada de fosfatos 0.1 M a pH 7.35 a 7.45. Los huesos tardan hasta un mes en descalcificarse, pero quedan muy bien preservados.
- Para descalcificar ojos y otros tejidos puede utilizarse una mezcla de citrato de sodio al 20% + ácido fórmico al 50% ²⁴; por uno a cinco días, seguida de enjuague en agua corriente por 16 horas.
- Una mezcla con 8% de ácido clorhídrico (1 Normal) + 8% de ácido fórmico (2 Normal); de 4 horas a 10 días.
- Ácido fórmico al 5 % durante 2 a 5 días.
- Ácido sulfúrico al 5% por menos de 48 horas.
- Una mezcla con 1.2 ml de ácido nítrico, 8 g de ácido tricloroacético, 20 ml de solución fijadora de Bouin (*véase la página 47*) y 70 ml de agua, por menos de 3 días.
- Se obtiene una buena desmineralización de los granulomas tuberculosos poniéndolos en ácido fórmico al 40% en vacío de 115 mm de mercurio (en campana de desecación) por 90 minutos. Después se pasan a agua corriente por 15 minutos.
- Es posible y deseable utilizar soluciones descalcificadoras comerciales; las soluciones leves requieren mayor tiempo de tratamiento, pero dañan menos la muestra.

Inmediatamente después del tratamiento con ácido los tejidos se enjuagan en agua corriente por 18 a 24 horas y se incluyen en *histokinette*.

Si los tejidos se descalcifican insuficientemente, continúan duros y difíciles de cortar; si permanecen demasiado tiempo en las mezclas descalcificadoras, se pierde demasiado detalle celular y afinidad para los colorantes.

Otra forma para descalcificar tejidos rápidamente, aunque no muy constante, es procesar las piezas rutinariamente y una vez incluidas en parafina, rebajar el bloque y aplicarle a la cara rebajada una compresa empapada de ácido clorhídrico al 10 % disuelto en etanol al 70 % durante 10 minutos. Después se podrán cortar de uno a seis niveles más o menos descalcificados.

Descalcificación de lesiones tuberculosas

La descalcificación con ácido fórmico suele ser suficiente para la mayoría de las lesiones mineralizadas; sin embargo, las lesiones extremadamente duras no se ablandan completamente con este método.

Es muy importante recordar que, en los casos donde se sospeche de tuberculosis, las técnicas para descalcificar disminuyen la eficiencia de las tinciones ácido-resistentes, por lo que se recomienda que los tejidos para diagnóstico de tuberculosis NO sean descalcificados, sino que se utilicen cuchillas desechables en el microtomo.

CORTE EN CRIOSTATO

Los tejidos descalcificados se embeben en *O.C.T.* (rango -15 a -30 °C) ²⁵, se congelan rápidamente en el criostato y se cortan a 10 micrómetros de grosor.

Los cortes se adhieren a portaobjetos cubiertos con algún adhesivo (*véase la página 64*), se fijan por 10 minutos en formalina al 10%, se enjuagan en agua y se tiñen en las soluciones acuosas (HE, Papanicolau, etc.).

²⁴ Las soluciones independientes son estables a temperatura ambiente por varios meses; se combinan antes de usar.

²⁵ *Lab-Tek*, Westmont, Illinois.

Se secan los cortes en una tabla de montar a 50 °C, para después pasar a un secador de laminillas a 80 °C por 5 minutos. Se pueden observar algunos componentes de las lesiones, como células gigantes, restos mineralizados de tuberculosis, rosetas de actinobacilosis y actinomicosis y detalles celulares de neoplasias, lo suficiente para dar un diagnóstico en la mayoría de los casos, pero la congelación causa cambios citológicos menores.

INCLUSIÓN EN PARAFINA

Los tejidos se incluyen en parafina para poderlos rebanar a pocas micras de grosor. Los cortes por congelación (en criostato) no tienen la misma nitidez que los cortes de bloques de parafina. El proceso necesario para la inclusión en parafina comprende: enjuague del fijador, deshidratado, aclarado, impregnación en parafina y montaje en bloques.

Es necesario quitar el fijador antes de procesar la muestra; para muestras fijadas en formalina al 10% es suficiente enjuagar bajo el chorro de agua corriente. Las muestras fijadas en líquido de Bouin deben enjuagarse en solución de alcohol al 60% por 4 - 24 horas.

La deshidratación de las piezas se logra con varios cambios de soluciones alcohólicas. Se puede emplear alcohol etílico o alcohol isopropílico. Es importante reemplazar con frecuencia las soluciones más concentradas y el alcohol absoluto, pues tienden a hidratarse. Este es quizá el error más común de la inclusión de piezas en parafina.

El aclarado se logra con un disolvente que se pueda mezclar tanto con alcohol como con parafina; este disolvente puede ser xileno (xilol), tolueno, benceno, cloroformo o gasolina. El aclarador más común es el xileno, pero debe recordarse que es muy volátil, flamable, tóxico y carcinogénico, por lo que debe manejarse con cuidado.

Deben tenerse por lo menos dos jarras con parafina derretida para impregnación, de preferencia con punto de fusión bajo (56 °C).

Es muy importante revisar en forma periódica los termostatos de las jarras de parafina. La parafina de bloques antiguos puede reciclarse, y de hecho, mejora en forma considerable sus propiedades si se usa la mitad de parafina nueva y la mitad de parafina reciclada. Algunos autores recomiendan agregarle un 10% de cera de abeja para aumentar su elasticidad.

Es posible utilizar parafinas de bajo peso molecular (*paraplast X-tra*²⁶) con punto de fusión de 52 a 54 °C.

La matriz de cuadros para formar los bloques de parafina puede fabricarse localmente con solera de aluminio. En lugar de jarras de parafina, se pueden usar recipientes metálicos calentados en hornilla eléctrica. La parafina derretida es muy flamable, por lo que debe mantenerse alejada del fuego.

La técnica de inclusión de tejidos de mamíferos (14 horas) empleando un *histokinette*, sugerida por A.F.I.P. (Prophet, 1995) y la técnica empleada para procesamiento manual de piezas más grandes que las capsulitas comunes se muestran en el cuadro 7 (*página 63*).

- Los tejidos de aves y reptiles pueden procesarse en la mitad de los tiempos anotados para mamíferos (McElroy, 1995).
- Los insectos y otros artrópodos fijados, se remojan 24 horas en una solución alcohólica de fenol al 4 % para ablandar la quitina de su exoesqueleto antes de incluirlos en parafina (McElroy, 1995). El bloque de parafina se remoja toda la noche antes de cortarlo en el microtomo.
- Los parásitos fijados se colocan en alcohol N butírico 6 + 6 horas, luego se infiltran con una solución a partes iguales de alcohol N butírico y parafina derretida por 24 horas a 60 °C (McElroy, 1995).

Las soluciones del *histokinette* deben cambiarse cada semana cuando se trabajan dos

²⁶ *Sigma Chemical Company.*

canastas diarias. El nivel adecuado de estas soluciones debe conservarse; no deben bajar más de una pulgada del borde superior.

El proceso de inclusión se puede realizar en forma manual si no se cuenta con un *histokinette*, pero es extraordinariamente laborioso.

Cuadro 7. TÉCNICAS DE INCLUSIÓN EN PARAFINA (horas).		
<i>Solución</i>	<i>Histokinette</i>	<i>Manual</i>
Etanol 80%	1	1
Etanol 96%	1+1+1	2+2+2
Etanol 100%	1+1+1	* +1+1
Xileno	1+1+1	1+1+1
Parafina	1+1+1	2+2
Parafina	1	2
* Se mantiene toda la noche en esta solución.		

Se pueden realizar inclusiones rápidas (4 horas) en cortes delgados y biopsias con la técnica siguiente (Prophet *et al*, 1995):

Etanol 96%	20+20+20 minutos
Etanol 100%	15+15+15 minutos
Mezcla de etanol absoluto + xileno	15 minutos
Xileno	15 + 15 minutos
Parafina	15 + 15 + 15 minutos
Parafina al vacío	20 minutos

PROCESO DE TEJIDOS CON CRISTALES HIDROSOLUBLES

Para demostrar los cristales de oxalatos en riñón puede resultar conveniente usar formalina al 10% en solución de Holmes a pH 9 (véase la página 46), u otro fijador (y soluciones deshidratantes) a pH alto, pues los cristales se disolverían a pH ácido o neutro.

Una opción para demostrar cristales de oxalatos en tejidos y que también es útil para cristales de uratos, es fijar los tejidos en etanol absoluto y de allí pasarlos a dos cambios de parafina derretida e incluir. Al cortar los niveles, no deben dejarse mucho tiempo en el

baño de flotación. Los cristales de urato en los cortes se tiñen rápidamente en una solución de nitrato de plata y metenamina²⁷ (Haas, 1981)

Para identificar cristales de oxalatos, uratos y colesterol en tejidos animales puede resultar más práctico el observar improntas simples de órganos frescos bajo luz polarizada, sea en el microscopio (véase la página 56), o empleando una fuente de luz polarizada y anteojos polarizados.

CORTE CON MICROTOMO

Los bloques de parafina se cortan en un microtomo, con una cuchilla especialmente afilada.

La elección del tipo de microtomo, cuchilla, forma del filo y ángulo de corte es por preferencias personales y limitaciones presupuestales. El afilado de las cuchillas se hace en una máquina especial; cuando no se cuenta con un aparato afilador de cuchillas, estas se pueden afilar a mano. La instalación de un lomo metálico en el dorso de la cuchilla y un mango en el extremo permite manejarla adecuadamente para afilarla en una piedra muy fina, empleando aceite ligero como lubricante.

Es posible usar cuchillas desechables con un adaptador *ad hoc*; y, en lugar de comprar las cuchillas desechables largas importadas, se pueden montar navajas de afeitar (*Guillette*).

Es conveniente que los bloques de parafina se rebajen primero en un microtomo con una cuchilla regular, y se reserven las mejores cuchillas para realizar los cortes que se montarán en las laminillas, para lo cual se utiliza un microtomo diferente.

El ángulo entre la cara de corte del bloque de parafina y el bisel afilado de la cuchilla oscila entre los cinco y diez grados para la mayoría de los cortes, aunque algunos tejidos duros como el útero requieren un ángulo de hasta 15 grados.

Algunos tejidos se cortan con mayor facilidad si la cara rebajada del bloque de

²⁷ Hexametilentetramina

parafina se enfría con una compresa húmeda refrigerada. Otros tejidos se cortan mejor si la cara del bloque se entibia.

Los bloques de órganos que tienen gruesas cápsulas fibrosas deben orientarse con la cápsula hacia arriba.

La obtención de buenos cortes delgados (de tres a seis micras) de bloques con tejidos incluidos en parafina requiere:

- Cuchillas con excelente filo, sin melladuras.
- Ángulo correcto de orientación cuchilla - bloque.
- Velocidad de corte moderada.
- Sujeción firme del bloque en el microtomo.
- Microtomo en buen estado y lubricado.
- Parafina de consistencia adecuada.
- Piezas procesadas en forma correcta.
- Mucha, mucha práctica.

MONTAJE EN LAMINILLAS

Los niveles cortados en el microtomo se ponen a flotar en una tina con agua tibia (45 °C), para poderlos estirar, separar y montar en portaobjetos.

Las laminillas o porta-objetos limpios y desengrasados se introducen al agua de la tina, se sacan con un corte de parafina, se escurren y dejan reposar en una platina caliente antes de pasar al tren de tinciones.

El agua de la tina de flotación tiene gelatina como adhesivo, a razón de tres cucharaditas de solución al 5% por litro de agua. Para evitar la contaminación bacteriana del agua (desastrosa), ésta debe cambiarse diario, y agregar unas gotas de timerosal (*merthiolate*) o timol como preservador.

Adhesivos para laminillas

Es posible y en ocasiones necesario (especialmente en histoquímica, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*), agregar un adhesivo a los portaobjetos antes de montar los cortes en ellos. Además de la gelatina arriba descrita, pueden utilizarse:

- albúmina de huevo de Mayer:
50 ml de clara de huevo + 50 ml de glicerina; se aplica una capa delgada a la laminilla antes de usarla.
- baño en gelatina / alumbre de cromo:
3 g de gelatina + 0.5 g de sulfato potásico de cromo (alumbre) + cbp un litro de agua destilada. Se calienta el agua a 60 °C, se disuelve la gelatina con agitación y se añade lentamente el sulfato potásico de cromo. Se pueden añadir unos pocos cristales de timol como preservador. Las laminillas se remojan en la solución tibia, se secan al aire y se almacenan hasta usarse.
- baño en solución acuosa al 15 % de pegamento de caseína²⁸ seguido de secado al aire libre de polvo
- baño en soluciones de silano²⁹ seguido de secado al aire
- baño en soluciones de poli-L-lisina³⁰ seguido de secado al aire
- laminillas comercialmente cubiertas con silano³¹ o poli-L-lisina³², preparadas especialmente para inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

COLORACIÓN H.E.

.El contraste resultante del color azul de la hematoxilina (colorante alcalino) y el color rojo de la eosina (colorante ácido) hacen de la técnica de hematoxilina eosina (H.E.) la mejor elección para histopatología rutinaria.

²⁸ *Elmer's Glue-All*, Borden Inc., Columbus, Ohio, U.S.A.

²⁹ Aminoalquilsilano.

³⁰ *Sigma Chemical Company*. # catálogo P 0296.

³¹ *Sigma Chemical Company*. # catálogo S 4651.

³² *Sigma Chemical Company*. # catálogo P 0425.

La mayor parte de las técnicas de tinción, incluso la rutinaria H.E., han sido consideradas fáciles de realizar, y en efecto lo son si se siguen al pie de la letra las indicaciones para la preparación de las soluciones y los colorantes, así como el proceso de tinción; no debe olvidarse el manejo correcto de la muestra desde su recolección hasta el montaje del cubreobjetos. En resumen, es necesario seguir con cuidado los pasos marcados en las *recetas* y sus respectivas indicaciones.

La técnica de coloración con H.E. requiere la desparafinación del corte, la hidratación progresiva para poder emplear la solución acuosa colorante de hematoxilina, la diferenciación del colorante a pH alto, la tinción contrastante con eosina y la deshidratación y aclarado necesarios para el montaje definitivo del cubreobjetos con resina.

Preparación de las soluciones

El alcohol ácido se prepara con 10 ml de ácido clorhídrico concentrado (fumante, al 35% de gas) disueltos en 1000 ml de etanol al 70%.

La solución de agua amoniacal se prepara con dos o tres ml de hidróxido de amonio al 28% (amoniacal) disueltos en un litro de agua de la llave. Esta solución se puede reemplazar por una solución de carbonato de litio al 1 % en agua destilada.

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina³³ en cristales 5 g
 Etanol absoluto 50 ml
 Alumbre de amonio o
 potasio 100 g
 Agua destilada 1000 ml
 Oxido rojo de mercurio 2.5 g

- Se disuelve perfectamente la hematoxilina en el alcohol (*véase la nota más adelante*).
- Se disuelve el alumbre en agua, calentándola sin hervir.

- Se mezclan rápidamente ambas soluciones y se calienta a ebullición (en menos de un minuto) con flama alta, con agitación continua.
- Se adiciona lentamente el óxido de mercurio.
- Se recalienta levemente hasta que se torne morado oscuro.
- Se enfría en el mismo matraz bajo el chorro de agua.
- Es opcional el agregar de dos a cuatro por ciento de ácido acético glacial.
- Se filtra y se guarda en frasco ámbar.

Nota: Debido a que se usa etanol, esta solución NO puede emplearse como colorante de contraste en inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, porque el alcohol podría disolver la sustancia coloreada que la enzima produjo a partir del cromógeno. Para inmunohistoquímica deben emplearse sólo soluciones acuosas de colorantes.

Eosina alcohólica

- Se prepara una solución concentrada de eosina:

Eosina Y ³⁴ soluble	
en agua.....	1 g
Agua destilada	20 ml
- Se disuelve la eosina y se agregan 80 ml de etanol 96% (*véase la nota en hematoxilina de Harris*).

³³ C.I. 75290.

³⁴ Eosina amarillenta, C.I. 45380.

Cuadro 8. RUTINA DE TINCIÓN H.E.		
<i>Solución</i>	<i>A.F.I.P.</i>	<i>Palo Alto</i>
Xileno	2+7 minutos.	2+2+2 minutos.
Etanol 100%	1+1 min.	2+2 min.
Etanol 96%	1+1 min.	2+2 min.
Etanol 80%	-	2 min.
Agua de la llave	10 a 20 min.	20 min.
Hematoxilina de Harris	15 min.	15 min.
Agua de la llave	enjuague	enjuague
Alcohol ácido	3 a 10 sumergidas	7 sumergidas
Agua de la llave	enjuague	enjuague
Agua amoniacal o solución de carbonato de litio	3 a 5 sumergidas	3 a 5 sumergidas
Agua corriente	10 a 20 minutos	20 minutos
Eosina	15 segundos a 2 minutos	15 segundos a 2 minutos
Agua de la llave	-	enjuague
Etanol 96%	2+2+2 minutos	2+2+2 minutos
Etanol 100%	2+2+2 minutos	2+2+2 minutos
Xileno	2+2+2 minutos	2+2+2 minutos

- Se guarda en lugar fresco y oscuro.

Para colorear se prepara una solución de trabajo de eosina:

Solución concentrada de eosina .. 1 parte
Etanol 80% 3 partes

- Se mezclan y se agrega 0.5% de ácido acético glacial.
- Se agita y se usa de inmediato, hasta por una semana.

RUTINA DE TINCIÓN H.E.

Las soluciones y tiempos recomendados por el A.F.I.P. (Prophet, 1995) y las realizadas en Palo Alto se muestran en el cuadro 8 (*página 66*).

- El cubreobjetos se monta con resina sintética. Las laminillas se etiquetan y dejan secar. Se ven al microscopio y si algo salió mal, volver a empezar. Si todo salió bien, fin.

ALGUNOS DETALLES IMPORTANTES

Los colorantes en polvo se disuelven mejor si se muelen previamente, de preferencia en un mortero de vidrio, y con mucho cuidado, porque un granito tirado pinta por meses todo lo que toca.

En lugar de la resina o bálsamo de Canadá puede usarse el medio de montaje DPX, que puede comprarse ya hecho ³⁵ o prepararse con:

Distrene 80 10 g
Dibutylphthalate
(Phtalic acid dibutylester)
(n-butyl phthalate) ³⁶ 5 ml
Xilol 35 ml

Este medio seca más rápido que el bálsamo de Canadá, y una vez seco se puede quitar raspándolo con espátula, sin necesidad de usar

³⁵ *Sigma Aldrich Química*. # catálogo 31,761-6.

³⁶ *Sigma Chemical Company*. # catálogo D 2270.

disolventes. Desafortunadamente, el distrene 80 es difícil de conseguir.

Cuando no pueden emplearse soluciones alcohólicas ni disolventes del tipo del xilol para montar los cubreobjetos (por ejemplo: en algunas técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas), es posible emplear glicerina en solución amortiguada de fosfatos y sellar las orillas de los cubreobjetos con barniz de uñas transparente. Otra posibilidad es emplear medios de montaje hidrosolubles, de los que existen comercialmente disponibles³⁷.

Todas las soluciones deben estar perfectamente identificadas, incluyendo las fechas de preparación y caducidad.

Es muy importante evitar confundir los colorantes indicados en las técnicas de tinción con otras sustancias con nombres similares y propiedades diferentes. Para esto se emplean los números clave de **índice de colorante** (abreviado **C.I.**). Por ejemplo: deben distinguirse la nueva fucsina (*C.I.* 42520) usada en la tinción en frío para bacterias ácido-resistentes, de la fucsina básica (*C.I.* 42500) empleada para teñir flagelos, de la fucsina ácida (*C.I.* 42685) utilizada en la técnica de Van Giesson para colágena.

Las soluciones de colorante se guardan en frascos de color ámbar, en lugar fresco y seco, y deben filtrarse antes de usarlas, a menos que se especifique lo contrario.

Los tiempos de coloración recomendados son muy variables. Debe de observarse la intensidad de tinción de los cortes, para disminuir o aumentar los tiempos de acuerdo al aspecto de las laminillas a la observación microscópica.

Todas las soluciones del tren de tinción deben permanecer muy bien tapadas para evitar la evaporación y contaminación.

Todos los frascos con soluciones del tren de tinciones deben mantenerse suficientemente

lentos (para que cubran por completo las laminillas que se sumerjan en ellos), y reemplazarse con periodicidad, de acuerdo a la carga de trabajo y la temperatura ambiental; en forma rutinaria se cambian cada semana. La aparición de *natas* sobre la superficie indica la necesidad de reemplazo inmediato.

Para disminuir el gasto de disolventes, se puede reemplazar sólo la solución más concentrada; las demás soluciones se obtienen por dilución de la solución contigua. Por ejemplo, en los alcoholes para hidratar, se reemplaza el primer alcohol absoluto por alcohol absoluto nuevo, la primera caja pasa a ocupar la segunda posición, la segunda se va a la tercera (última), el último alcohol absoluto se diluye con cuanta agua baste (usualmente muy poca) para alcanzar el 96%, y así sucesivamente.

Las soluciones alcohólicas deben medirse siempre con un alcoholímetro, que es un densímetro calibrado, con escala directa para concentración de etanol en agua en condiciones normales.

LECTURAS RECOMENDADAS

Las siguientes referencias pueden servirle al lector interesado en ampliar la información sobre coloraciones para histología:

- Culling, C. F. A.: *Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques*. Butterworths, London, 1974.
- Haas, E.: *50 Diagnostic Special Stains for Surgical Pathology*. J. B. Lippincott, Philadelphia, U. S. A, 1981.
- Humason, G. L.: *Animal Tissue Techniques*. Freeman, San Francisco, U. S. A, 1979.
- McElroy, D.: Histotecnología de tejidos animales e insectos, en: Prophet, E. B; Mills, B; Arrington, J. B; Sobin, L. H.(editores): *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas, Registro de Patología de los Estados Unidos de América, Washington, D. C, 1995.
- McGavin, M.D. & Thompson, S. W. *Specimen dissection and Photography*. Charles C. Thomas, Springfield, U. S. A, 1988.

³⁷ *Glycergel*, DAKO Corporation.

Prophet, E. B.: Procesamiento de tejidos: deshidratación, aclaramiento e infiltración, en: Prophet, E. B; Mills, B; Arrington, J. B; Sobin, L. H. (editores): *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas, Registro de Patología de los Estados Unidos de América, Washington, D. C, 1995.

Revisión y descripción de cortes histológicos

Guillermo Valero Elizondo

Examen

Examen de neoplasias

Descripción escrita

Diagnóstico morfológico

Etiología, diagnóstico etiológico, nombre de la enfermedad

Conclusión o comentario

EXAMEN

Es esencial una revisión sistemática de cada corte para **asegurar que todos los componentes sean examinados**. Por ejemplo, cuando se revisa un corte de pulmón se puede comenzar con los bronquios y bronquiolos, para continuar con los alvéolos, septos alveolares, vasos sanguíneos, septos interlobulillares y la pleura visceral. Igualmente, si se examina un corte de intestino, empezar con la superficie del lumen y después revisar cada capa hasta la serosa, inclusive. Cada persona debe establecer su propio patrón para el examen sistemático de cada órgano.

La técnica para el examen de un corte histológico variará dependiendo de si se elige describir la laminilla durante, o después de la revisión (*véase más adelante*), pero los siguientes principios generales son recomendables:

1. El microscopio debe estar funcionando correctamente, con el voltaje y los filtros

adecuados e iluminación de Köhler (*véase la página 54*).

1. Cerciórese que la laminilla se encuentra correctamente rotulada con el número de identificación de la muestra y de ser posible la tinción utilizada. Cuando se trate de cortes con inmunofluorescencia, o inmunohistoquímica es imprescindible que en la laminilla aparezca el nombre del anticuerpo que se empleó.³⁸
1. Examine brevemente la laminilla a simple vista. Esto puede ayudar a identificar los tejidos y proporcionar información sobre la distribución y naturaleza de las lesiones.
1. Revise todo el corte usando el objetivo de bajo aumento. Identifique el tejido si es posible y determine la localización, extensión y características generales de las lesiones. En la medida de lo posible, asegúrese que la tinción esté bien hecha y tenga un buen contraste, para evitar errores en la interpretación. Siempre que utilice tinciones especiales (*página 76*) verifique la laminilla testigo correspondiente. Al menos debe haber una laminilla de testigo positivo conocido y a menudo se requiere también un testigo negativo conocido.
1. Usando objetivos mediano y seco fuerte, examine áreas selectas del tejido con mayor detalle para caracterizar mejor los cambios y para buscar la presencia de organismos (bacterias, parásitos, inclusiones virales³⁹) Asegúrese de revisar todos los componentes de cada tejido y todos los cortes que se encuentren en la laminilla.
1. El examen de los cortes con objetivo de inmersión rara vez es necesario. Puede ayudar a la identificación de algunos organismos, o proporcionar información sobre detalle celular fino, pero debe usarse con

³⁸ En la hibridación *in situ* (*página 92*) deberá anotarse la sonda que se empleó.

³⁹ Consulte la lista de cuerpos de inclusión en la página 158.

medida (véase la página 54 del capítulo sobre uso del microscopio).

Examen de neoplasias

En lesiones neoplásicas (véase el capítulo de la página 97) debe tenerse mucho cuidado en evaluar los datos que por si solos o en conjunto servirán para determinar si la lesión es **benigna** o **maligna**:

- necrosis
- hemorragia
- infiltración a la cápsula
- número de mitosis
- mitosis anormales
- grado de celularidad
- pleomorfismo o atipia celular
- permeación vascular (vasos sanguíneos y linfáticos)
- presencia de otras células o arreglos celulares:
 - * células gigantes y tipo
 - * rosetas
 - * cuerpos de Call - Exner
 - * túbulos
 - * papilas
 - * glándulas
 - * palizadas
 - * patrón organoide
 - * patrón trabecular, etc.
- material agregado:
 - * amiloide,
 - * osteoide,
 - * colágena
 - * moco
 - * calcificación distrófica
 - * cuerpos de psamoma
 - * perlas córneas.

DESCRIPCIÓN ESCRITA

A pesar de que existe una considerable variación de opiniones entre patólogos respecto a las técnicas para describir los cortes histológicos, el objetivo básico debe ser el presentar una imagen precisa de la localización, exten-

sión, severidad y naturaleza de las anomalías, para que puedan visualizarse los cambios sin haber visto la laminilla. Las descripciones deben ser **concisas**, **usar la terminología correcta** y **seguir una secuencia lógica**.

- Una técnica es empezar la descripción sólo cuando el examen está más o menos completo. Esto permite organizar la descripción y ordenar los hallazgos en orden de importancia. En casos complejos puede ser necesario el tomar notas breves durante el examen.

La primera oración debe ser una introducción que proporcione información general, como el tipo de tejido (en forma tan precisa como sea posible) junto con el tamaño, localización y extensión de las lesiones principales. Por ejemplo: *“En este corte de piel y anexos hay una masa hiper celular discreta sin encapsular, de aproximadamente un centímetro de diámetro, en la dermis, que desplaza al tejido anexo adyacente y causa elevación de la epidermis intacta sobre de ella.”*

- Esta oración debe seguirse con una descripción más detallada de la lesión, incluyendo tipos de células inflamatorias, organización y morfología de células neoplásicas, y tipo de necrosis si está presente (caseosa, coagulativa...). Si se encuentran organismos, describir su morfología y posición e identificarlos tan precisamente como se pueda.
- Finalmente, describir brevemente otras alteraciones significativas pero menos importantes del corte. En las biopsias quirúrgicas se debe mencionar si es que la lesión se extiende más allá del borde del espécimen, especialmente si es una neoplasia.

Un método alternativo es describir cada componente del tejido en forma separada durante el examen de la laminilla. Por ejemplo: cuando se revisa un corte de piel, describir todos los cambios en la epidermis, empezando con una descripción a bajo aumento de la distribución y

extensión de las lesiones, seguida de una descripción más detallada, y a continuación describir los cambios en la dermis, y finalmente en tejido subcutáneo. Este método asegura que todo el corte se examinará y describirá en forma sistemática.

DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO

Este es en esencia un resumen de la descripción morfológica. Para una lesión inflamatoria o degenerativa, el diagnóstico morfológico debe incluir una indicación de la duración, extensión, tipo de exudado o degeneración, localización y el órgano afectado. Por ejemplo: *nefritis intersticial supurativa focal aguda*, o *necrosis cortical renal difusa aguda*. Se pueden incluir características adicionales, tales como trombosis vascular, inclusiones virales, hifas fungales, etc. Para una neoplasia el diagnóstico morfológico es de hecho el tipo de neoplasia. Por ejemplo: *carcinoma de células escamosa de la tonsila*, *adenocarcinoma de glándula mamaria*, etc. Debe tenerse en mente que un corte de tejido puede tener dos o más diagnósticos morfológicos.

ETIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO, NOMBRE DE LA ENFERMEDAD

El término “diagnóstico etiológico” rara vez se utiliza, y a pesar de que tiene un significado diferente al de “etiología”, a menudo se asume incorrectamente que son sinónimos. Las diferencias se pueden observar mejor en los ejemplos del cuadro 9 (*en la página 1*).

Para las enfermedades con una etiología metabólica o genética debe intentarse ser tan preciso como sea posible en el diagnóstico. Por ejemplo: la etiología de la mannosidosis bovina sería “*defecto genético en la actividad de la alfa manosidasa*”.

A menos que la etiología sea concluyente, debe enlistarse un diagnóstico diferencial, que concluya con una oración que indica cual diagnóstico es el más probable.

Cuando se trate de enfermedades que tengan varios nombres, deberá utilizarse el de mayor aceptación y en dado caso entre paréntesis mencionar algún otro nombre con el que también se conozca y evitar al máximo el empleo de epónimos.

CONCLUSIÓN O COMENTARIO

Debe concluirse con una oración corta respecto a la patogénesis de las lesiones descritas y su significancia en el caso. Debe comentarse con respecto a la relación entre los signos clínicos y las lesiones macro y microscópicas; sugerirse el comportamiento biológico esperado de la lesión (benigno o maligno) y en estudios de necropsia la causa probable de la muerte. Esta es probablemente la parte más importante de la descripción, pues involucra la interpretación de los hallazgos. Cuando se trate de una lesión poco común o de reciente descripción, conviene incluir en el informe un par de citas bibliográficas relacionadas al caso.

Cuadro 9. EJEMPLOS DE ENFERMEDADES Y SUS DIAGNÓSTICOS.		
Nombre de la enfermedad	Diagnóstico etiológico	Etiología
Enfermedad del músculo blanco	miopatía nutricional	deficiencia de Selenio / vitamina E
Fiebre de embarque	pasteurelosis pulmonar	<i>Pasteurella hemolytica</i>
Neumonía proliferativa ovina	neumonía viral	retrovirus ovino
Panleucopenia (enteritis infecciosa) felina	enteritis viral	parvovirus felino
Paraqueratosis porcina	dermatosis nutricional	deficiencia de zinc
Paratuberculosis bovina ¹	enteritis bacteriana	<i>Mycobacterium avium</i> spp <i>paratuberculosis</i>
Saturnismo	encefalopatía tóxica	plomo
Verminosis intestinal canina	enteritis parasitaria	<i>Ancylostoma caninum</i>

Citología diagnóstica

Nuria de Buen de Argüero

Introducción

Fijación

Citología de mucosas

Improntas

Raspados

Punción con aguja delgada (PAD)

Contraindicaciones de PAD

Empleo de PAD

Citología de líquidos

Lavados

Lavado bronquial

Comentario final

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico citológico se basa en la observación de las células que exfolian normalmente o que son recolectadas mediante algún procedimiento clínico. No sólo tiene gran utilidad en la toma de muestras en animales vivos, sino también en las recolectadas durante las necropsias, donde con la toma de improntas se puede en ocasiones llegar al diagnóstico del caso, evitando de esta forma el proceso de inclusión en parafina, lo cual implica más tiempo y mayor costo.

El material para estudio citológico se observa en frotis obtenidos de mucosas, improntas, raspados, punciones con aguja delgada (PAD) y líquidos; permitiendo hacer diagnósticos de procesos inflamatorios bacterianos, virales, parasitarios, micóticos, neoplasias y procesos degenerativos.

FIJACIÓN

El fijador más utilizado para estudio citológico es el alcohol de 96°. La fijación debe hacerse inmediatamente después de realizado el frotis, para evitar cambios celulares y artificios que interfieran con el diagnóstico.

Se recomienda remitir de rutina dos laminillas fijadas con alcohol de 96° y dos secadas al aire sin fijador.

CITOLOGÍA DE MUCOSAS

Los frotis podrán obtenerse de las siguientes mucosas: conjuntiva ocular, de cavidad oral, cavidad nasal y vagina

La citología vaginal es útil en el diagnóstico de procesos inflamatorios específicos e inespecíficos como hiperplasias endometriales asociadas a piometras cerradas o abiertas; neoplasias, y en la valoración de citología hormonal para determinar las etapas del ciclo estral y gestación. Para el frotis de mucosa vaginal se requerirá: hisopo o espátula de Ayle, laminillas, espéculo sin lubricante y dos clips para separar las laminillas en el fijador.

Para el frotis de mucosa conjuntival se usará: xilocaína, bisturí y laminilla.

IMPRONTAS

Mediante improntas se pueden hacer diagnósticos citológicos transoperatorios, de piezas quirúrgicas y de material de necropsias. El material necesario para producir improntas son laminillas y fijador.

Se pueden usar improntas o frotis para diagnóstico de enfermedades infecciosas bacterianas, tales como micobacteriosis (tinción de Ziehl-Neelsen, véase la página 79), clostridiasis (tinción de Gram y/o anticuerpos fluorescentes), campylobacteriosis (ZN modificado), treponemas (Warthin-Starry); clamidiasis (tinción de Machiavelo); y enfermedades virales como el moquillo y parvovirus canino. En muchos casos, la información diagnóstica que tradicionalmente requería esperar los resultados de la histopatología,

puede obtenerse mediante simples improntas o raspados, en menor tiempo y a menor costo.

RASPADOS

Para realizar raspados se usarán laminillas y un escoriador de doble filo, bisturí o *exacto*.

Para obtener un buen raspado se debe desinfectar el área antes de raspar enérgicamente con el escoriador, desechando el primer material obtenido; volver a raspar y con este material efectuar los frotis, que deberán fijarse de inmediato.

PUNCIÓN CON AGUJA DELGADA (PAD)

Con el método de **PAD** se pueden obtener muestras de masas palpables superficiales o lesiones localizadas en órganos internos con ayuda de ultrasonido, rayos X, fluoroscopia, gammagrafía y tomografía computada, para llegar al diagnóstico preciso del tipo de lesión.

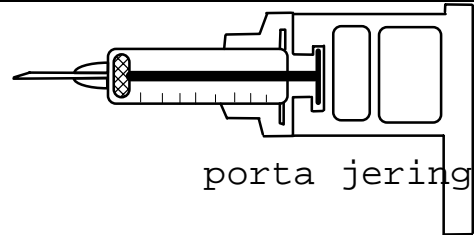
La **PAD** ofrece ventajas respecto a la toma de biopsia quirúrgica. Algunas de ellas son:

- Es un procedimiento inocuo, ya que la **PAD** no produce diseminación de las neoplasias; se puede realizar sin anestesia
- permite puncionar tantas áreas como se deseen
- su costo es bajo
- y permite realizar diagnósticos en menor tiempo que la biopsia quirúrgica.

Por lo mencionado anteriormente, la **PAD** debe usarse como el primer recurso diagnóstico.

El material necesario para **PAD** son:

- aguja calibre 21
- jeringa de 10 ó 20 ml
- porta-jeringa
- laminillas.



Para realizar **PAD** de pulmón, hígado y próstata se deben tomar en cuenta los siguientes factores:

Contraindicaciones de PAD

Intratorácica

La **PAD** no está indicada :

- en lesiones localizadas en el hilio
- en pacientes con hipertensión pulmonar
- si existe diátesis hemorrágica
- ante la sospecha de malformaciones arteriovenosas
- ante la sospecha de quiste hidatídico.

Hepática

- Con tiempo de protrombina anormal.

Próstata

- Si se sospecha de prostatitis se debe dar terapia con antibióticos 72 horas antes de realizar la **PAD**.

Empleo de PAD

En medicina veterinaria la **PAD** es ampliamente utilizada para llegar al diagnóstico de nódulos palpables en:

- glándula mamaria
- piel
- tiroides
- testículo
- glándulas salivales
- nódulos linfáticos.

En menor escala se ha realizado **PAD** en: lesiones intratorácicas, hígado, riñón y masas abdominales.

CITOLOGÍA DE LÍQUIDOS

Se puede hacer citología a partir de:

- líquidos cefalorraquídeo, pleural, pericárdico, peritoneal y articular,
- orina, y
- lavados nasales y bronquiales.

Una vez obtenidos los líquidos, deben transportarse de inmediato al laboratorio para su proceso; de no ser así, agregar una tercera parte de alcohol de 96°.

Las técnicas para obtención de líquidos varían según el caso. Así, para orina puede ser espontánea, por sondeo o punción vesical. El líquido cefalorraquídeo se puede colectar por punción lumbar o en la cisterna magna (entre atlas y agujero magno). El líquido pleural se obtiene por toracocentesis y el peritoneal por paracentesis, mientras que el líquido articular con una punción intraarticular (*véase la página 147*).

LAVADOS

Para la realización de lavados se requiere de instrumental específico dependiendo del tipo de lavado que se va a realizar. En nuestro medio los que más se efectúan son lavados broncoalveolares y nasales.

Lavado broncoalveolar

Para el lavado bronquial se prefiere utilizar un broncoscopio, tubos de Luken, solución salina y una bomba de aspiración.

COMENTARIO FINAL

La sensibilidad de la citología es elevada; esto quiere decir que en la mayoría de los casos se puede señalar de qué lesión se trata (inflamatoria o neoplásica), aunque a veces la especificidad no lo es tanto; esto se refiere a que en algunas neoplasias no es posible determinar la estirpe histológica. Sin embargo, el hecho de poder informar a un clínico que se trata de un tumor maligno es muy importante, ya que esto

le permite tomar una conducta terapéutica adecuada en un tiempo más corto.

Histoquímica diagnóstica

*Germán Valero Elizondo
Guillermo Valero Elizondo
Rafael Colín Flores
Beatriz Vanda Cantón*

Introducción

Tinción de Giemsa

Tinciones de Gram

Técnica del ácido peryódico de Schiff (PAS)

Histopatología de lesiones tuberculosas

Ziehl–Neelsen

Nueva fucsina

Auramina O

Auramina O + naranja de acridina

Tinciones de Stamp y de Köster para *Brucella*

Azul de toluidina

Técnica de Von Kossa para sales de calcio

Blanqueado de melanina

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

Si bien debe ser la norma de todo laboratorio de histopatología trabajar excelentemente la técnica de coloración H.E., en ocasiones resulta útil el poder demostrar algunas características de un caso mediante tinciones especiales. En general, todas las tinciones especiales requieren que se procese en forma simultánea el caso problema, un testigo positivo y un testigo negativo conocidos, pues la probabilidad de error es mayor cuando no se tiene familiaridad con un procedimiento.

En el cuadro 10 (*página 1*) se enlistan las tinciones especiales más comunes en

histopatología, las estructuras que detectan y el color con el que se observan.

TINCIÓN DE GIEMSA

Existen variaciones sobre la técnica de Giemsa. La que aquí se describe es particularmente útil para cortes histológicos.

Se prepara una solución concentrada de colorante de Jenner⁴⁰:

colorante de Jenner 1 g
metanol 400 ml

Se prepara la solución de trabajo del colorante de Jenner:

solución concentrada 25 ml
agua destilada 25 ml

Se prepara la solución de Giemsa:

polvo de Giemsa⁴¹ 1 g
glicerina 66 ml
metanol 66 ml

Se mezcla el polvo con la glicerina y se calienta en el horno a 60 °C por una hora. Se añade el alcohol metílico y se mezcla bien.

Para diferenciar se puede emplear una solución de rosina al 1%:

rosina⁴² 1 g
etanol 96% 100 ml

Se prepara solución amortiguada de fosfatos (PBS) a pH 7 (*véase la página 45*).

Se hidratan los cortes y se practica la siguiente rutina:

Agua	5 minutos
metanol	5 + 5 min.
solución Jenner	6 min.
PBS	enjuague

⁴⁰ Mezcla de eosina y azul de metileno, obtenible comercialmente; SIGMA J-1875.

⁴¹ SIGMA G-5637.

⁴² SIGMA R-3755.

sacudir el <i>PBS</i>	
solución Giemsa	45 min.
sol. rosina (enjuagues rápidos)	1..5 sumergidas
agua destilada	5 sumergidas
deshidratar	
aclarar	
montar	

Los núcleos aparecerán teñidos de color azul, el citoplasma rosa y las bacterias azul pálido.

TINCIONES DE GRAM

La técnica de Gram permite detectar bacterias en tejidos y clasificarlas en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas. En los cortes histológicos, la presencia de detritos celulares y la coloración pálida de las bacterias dificultan su evaluación; por lo que en muchas ocasiones es preferible localizar las bacterias en el corte teñido con Giemsa, antes de revisar la misma zona en la laminilla teñida con Gram.

La tinción de **MacCallum-Goodpasture**, al igual que la coloración de **Brenn y Brown**, son variaciones de la técnica de Gram que proporcionan una mejor separación de colores, por lo que algunos patólogos las prefieren, especialmente para fotografía.

Se prepara una solución colorante de **Good-pasture**:

Fucsina básica ⁴³	0.59 g
anilina.....		1.00 ml
fenol derretido	1.00 ml
etanol 30%	98.00 ml

Se prepara una solución saturada de ácido pícrico en etanol 96%.

⁴³ Mezcla basada en parafucsina básica (*C.I.* 42500), disponible comercialmente; *SIGMA P-1528*.

Se prepara una solución de **violeta de genciana al 5% de Stirling**:

violeta de genciana ⁴⁴	5 g
etanol absoluto	10 ml
anilina	2 ml
agua destilada	88 ml

Se prepara **yodo de Gram (lugol, solución yodo-yodurada)** :

yodo fresco	1 g
yoduro de potasio	2 g
agua destilada	300 ml

Se disuelve el yoduro en agua tibia a 37 °C, se añade el yodo y se mezcla hasta que disuelva completamente. Es conveniente hacer la mezcla en campana de extracción de gases tóxicos, porque se libera ácido yodhídrico gaseoso, que es muy irritante.

La mezcla de anilina-xilol se prepara con 50 ml de anilina + 50 ml de xilol.

Para teñir los cortes, se procede a:

- Desparafinar e hidratar los cortes.
- Se enjuagan en agua por 5 minutos.
- Se tiñen con el colorante de Goodpasture por 10 minutos.
- Se lavan en agua corriente de la llave hasta que ya no escurra color rojo.
- Se diferencian en formaldehído al 36% (formalina, como viene en la botella), hasta que las laminillas tengan un color rosa pálido.
- Se contrastan en la solución de ácido pícrico por 5 minutos.
- Se lavan en agua por 3 minutos.
- Se enjuagan en etanol 96% por 5 minutos.
- Se colorean en la solución de violeta de genciana por 3 minutos.
- Se enjuaga bien en agua corriente de la llave, hasta eliminar el exceso de azul.
- Se pone la laminilla en yodo de Gram por un minuto. Este es un paso decisivo. Debe

⁴⁴ Cristal violeta, violeta básica 3, *C.I.* 42555.

usarse una solución de yodo fresca, y no deben teñirse más de 10 laminillas por cada 50 ml de solución de yodo.

- Se seca parcialmente el exceso de solución usando papel *Whattman* del número 1. No debe secarse por completo, porque entonces la anilina-xilol no quitaría todo el exceso de violeta de genciana. Los cortes deben dejarse húmedos, secando bien el área alrededor de ellos.
- Se enjuaga en anilina-xilol, con 4 cambios, hasta que la laminilla tenga un color lila claro.
- Se aclara en varios cambios de xilol y se monta.

Las bacterias **Gram positivas** se observan de color azul, mientras que las **Gram negativas** se observan de color rojo.

TÉCNICA DEL ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF (PAS)

La técnica del ácido peryódico de Schiff (*PAS*) es útil para demostrar la presencia de glucógeno, mucina, proteínas glicosiladas, membranas basales y hongos. Sin embargo, debe recordarse que la técnica de *PAS* no tiñe a *Blastomyces*.

Se prepara la solución de ácido peryódico (H_5IO_6) al 0.1%:

ácido peryódico 0.1 g
agua destilada..... 100.0 ml

Se prepara una solución de metabisulfito de sodio ($Na_2S_2O_5$) al 0.5%:

metabisulfito de sodio 0.5 g
agua destilada..... 100.0 ml

Se prepara una solución 1 N de ácido clorhídrico:

HCl concentrado 83 ml
agua destilada..... 917 ml

Se prepara el reactivo de Schiff:

fucsina básica 1 g
agua destilada 200 ml

ácido clorhídrico 1 N 20 ml
metabisulfito de sodio anhidro 1 g

La técnica es la siguiente:

- Disolver un gramo de fucsina básica en 200 ml de agua destilada tibia y calentar a ebullición.
 - Enfriar a 50 °C bajo el grifo del agua.
 - Añadir 20 ml de ácido clorhídrico 1 N.
 - Añadir un gramo de metabisulfito de sodio anhidro.
 - Calentar de dos a cinco minutos.
 - Refrigerar toda la noche. Al día siguiente la solución debe ser de color *beige* claro.
 - Añadir un gramo de carbón activado por cada 100 ml de solución.
 - Mezclar en agitador magnético por 30 a 60 minutos.
 - Filtrar en papel filtro grueso. El filtrado debe ser claro y transparente.
 - Se guarda en refrigeración en frasco oscuro. Debe sacarse del refrigerador 10 minutos antes de emplearse y después de usarse debe ponerse nuevamente en el refrigerador, donde se conservará por varias semanas.
 - Se prueba antes de usarse: Se ponen unas gotas de reactivo de Schiff en papel filtro y se añaden otras gotas de formalina. Si el papel se pone color de rosa, la solución si funciona.
 - Si la solución de Schiff que se usa continuamente se pone color de rosa, debe desecharse.
- a) Desparafinar e hidratar los cortes.
 - a) Enjuagar en agua 5 minutos.
 - a) Enjuagar en agua destilada con 15 sumergidas.
 - a) Oxidar con ácido peryódico por 15 minutos (para hongos se usa solución al 0.5% por 20 minutos).
 - a) Reactivo de Schiff por 10 minutos (para hongos se usan 25 minutos).

- a) Solución de metabisulfito con tres tinas de 2 minutos cada una.
- a) Se enjuaga en agua y se contrasta con hematoxilina para observar el detalle nuclear.
- Cuando se tiñen hongos, después de la hematoxilina se pasa a etanol 50% (10 sumergidas), etanol 70% (10 sumergidas) y solución de aurantia⁴⁵ por 15 segundos.
- i) Se pasa a etanol absoluto para aclarar y montar.

La técnica de *PAS* tiñe de color rosa - magenta los mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas y glicoproteínas. Los hongos se ven de color morado, el núcleo azul y el citoplasma dorado claro.

Se puede sustituir el colorante de contraste (hematoxilina) por otro que proporcione un mejor contraste; por ejemplo: una solución de ácido pícrico, que imparte un color amarillo leve uniforme a todo el fondo, permitiendo ver con mayor facilidad las estructuras *PAS* positivas.

Resulta interesante que algunas bacterias, tales como el *Fusobacterium necrophorus*, sean *PAS* positivos, lo que ayuda a su identificación en las laminillas.

HISTOPATOLOGÍA DE LESIONES TUBERCULOSAS

Ácido-alcohol-resistente (Ziehl-Neelsen)

Esta técnica es muy útil para diagnosticar tuberculosis, paratuberculosis y lepra. Por rutina, todos los granulomas de animales domésticos deberían colorearse con Ziehl-Neelsen (ZN) para comprobar o descartar la presencia de micobacterias. Debe recordarse

⁴⁵ Solución tóxica que contiene: aurantia 0.1 g, etanol 70% 98.75 ml, ácido acético glacial 1.25 ml.

que, además de las micobacterias, existen otras estructuras ácido-resistentes, tales como:

- *Nocardia asteroides*⁴⁶
- los gránulos de las células cebadas
- las inclusiones de ceruido asociadas con el envejecimiento celular
- los cuerpos de inclusión de plomo y
- los espermatozoides.

Los granulomas compatibles con tuberculosis pueden requerir descalcificación, pero esto disminuirá la afinidad para las tinciones ácido-resistentes (véase la página 60 del capítulo de técnica de histopatología).

Se prepara la solución de **carbol fucsina**:

fucsina básica	0.5 g
agua destilada	50 ml
fenol derretido	2.5 g
etanol absoluto	5 ml

Se disuelve la fucsina en agua tibia, se añade el fenol derretido y el etanol, se mezcla y guarda a temperatura ambiente. Se filtra en papel Whatman 2 antes de usar.

La solución para diferenciar (**alcohol ácido**) puede ser ácido clorhídrico al 1% en etanol 70%, o ácido sulfúrico al 1% en etanol 70%.

El colorante de **contraste** usual es una solución de **azul de metileno**:

azul de metileno ⁴⁷	1 g
etanol	10 ml
solución acuosa de	
fenol al 5 %	cbp 100 ml

La técnica de tinción para ácido-alcohol-resistentes es la siguiente:

- Se desparafinan e hidratan los cortes.
- Se mantienen en agua por 5 minutos.

⁴⁶ Para teñir *Nocardia asteroides* se añade 30% de aceite de cacahuete al xilol usado para desparafinar el corte.

⁴⁷ C.I. 52015.

- Se ponen en carbol fucsina por 30 minutos a 60 °C (en horno, estufa o platina caliente).
- Se enjuagan con agua por 5 minutos.
- Se diferencian en alcohol ácido por uno a cinco minutos, hasta que el fondo pierda su color.
- Se enjuagan en agua por 5 minutos.
- Se contrastan con azul de metileno por 10 a 30 segundos. Cuando se tiñe tejido linfático debe reducirse el tiempo, pues se tiñe con mayor afinidad que los demás tejidos.
- Se enjuaga en agua destilada, se deshidratan, aclaran y montan.

Las estructuras ácido-alcohol-resistentes aparecen de color rojo.

Los casos de tuberculosis y paratuberculosis deben notificarse a las autoridades sanitarias.

Nueva fucsina

La solución colorante de nueva fucsina lleva 10 g de nueva fucsina ⁴⁸, 50 g. de fenol y 100 ml de etanol 96%.

- Se añade el alcohol a los sólidos, que se disuelven con agitación constante.
- Después se añade agua destilada esterilizada en autoclave hasta completar 1000 ml.
- Se puede filtrar después de cada uso para reciclar.

Como tinción de contraste se puede emplear azul de metileno (*página 79*).

Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.
Etanol absoluto	2 min.
Etanol absoluto	2 min.
secado al aire	
Agua destilada autoclaveada	enjuagar
Nueva fucsina	7 a 10 min.

Solución acuosa saturada de carbonato de litio (nueva, recién preparada)	enjuagar
Solución de alcohol ácido ⁴⁹ , solución nueva para cada lote de laminillas	diferenciar
Agua autoclaveada	enjuagar
<i>Tinción de contraste</i> : nuevo azul de metileno	3 sumergidas
Agua autoclaveada	enjuagar
Etanol 95%	2 min.
Etanol absoluto	2 min.
Xilol	3 min.
Xilol	3 min.
Xilol	3 min.
<i>Montar cubreobjetos con resina sintética</i>	

- Es importante decolorar en alcohol ácido hasta que no escurra más color del corte. De no decolorarse suficientemente, pueden aparecer eritrocitos (y otras estructuras) erróneamente ácido-resistentes.

Auramina O

El uso de la tinción fluorescente de auramina O permite demostrar la presencia de micobacterias con mayor facilidad que la tinción de ZN. Se menciona que se pueden observar hasta tres veces más micobacterias con esta técnica. Una explicación es que esta técnica tiñe la pared, o fracciones de esta, de las micobacterias, mientras que el ZN solamente tiñe bacterias estructuralmente intactas. Para aumentar la retención del colorante se recomienda el emplear 30% de aceite de cacahuete en el xilol al desparafinar el corte (Haas, 1980).

Se prepara una **solución de auramina O al 0.3%** :

Auramina O⁵⁰ 0.3 g
 glicerol 7.0 ml

⁴⁸ C.I. 42520.

⁴⁹ 95 ml Etanol 96% + 5 ml ácido acético glacial.

⁵⁰ C.I. 41000.

fenol líquido 3.0 ml
 agua destilada..... cbp 100.0 ml

Esta solución no debe calentarse, se disuelve por agitación.

Se prepara una **solución decolorante**:

ácido clorhídrico 0.5 ml
 cloruro de sodio..... 0.5 ml
 metanol..... 75.0 ml

Se prepara una solución para teñir el **fondo**:

permanganato de potasio ... 0.1 g
 agua destilada..... 100.0 ml

- Los cortes se desparafinan e hidratan.
- Se sumergen 10 veces en agua destilada.
- Se mantienen en la solución de auramina por 10 minutos a 60 °C (en horno, estufa o platina caliente).
- Se enjuagan en agua por 2 minutos.
- Se decoloran en dos pasos de 2 minutos c/u.
- Se enjuagan en agua por 2 minutos.
- Se ponen en solución de permanganato de potasio por 2 minutos.
- Se enjuagan con 10 sumergidas en agua.
- Se deshidratan, aclaran y montan en medio no fluorescente.

Las micobacterias teñidas fluorescen de color amarillo claro.

Auramina O + naranja de acridina

- El empleo de naranja de acridina permite observar hifas de hongos. Las micobacterias teñidas fluorescen de color amarillo claro.
- Se prepara una solución de **auramina O**⁵¹ al 0.3%.
- Se prepara una solución al 0.025 % de **naranja de acridina**⁵² en agua destilada.
- Se prepara una solución de cloruro férrico al 10% en agua destilada.

Xilol	5 min.
Xilol	5 min.

⁵¹ C.I. 41000.

⁵² C.I. 46005

Xilol	5 min.
Etanol absoluto	2 min.
Etanol absoluto	2 min.
Secado al aire	
Agua destilada autoclaveada	2 min.
Solución de Auramina O al 0.3 %	10 min. o más
Agua autoclaveada	1 min.
Cloruro férrico 10 %	5 min.
Agua destilada autoclaveada	1 min.
Naranja de acridina al 0.025 %	2.5 min.
Agua autoclaveada	1 min.
Etanol 70 %	1 min.
Etanol 95%	1 min.
Etanol absoluto	1 min.
Xilol	3 min.
Xilol	3 min.
Xilol	3 min.
<i>montar cubreobjetos con resina no fluorescente</i>	

TINCIONES DE STAMP Y DE KÖSTER PARA BRUCELLA

Estas tinciones son modificaciones de la técnica ácido-resistente de Ziehl-Neelsen y se pueden usar en placentas para diferenciar *Brucella* de *Staphylococcus* y otras bacterias.

Tinción de Stamp

La coloración descrita por Stamp en 1950 se puede emplear en frotis, improntas o cortes hidratados.

- Los frotis se secan y fijan a la flama de un mechero.
- Se utiliza carbol fuscina de Ziehl-Neelsen (1 g fuscina básica disuelta en diez ml de etanol absoluto a los que se añaden 90 ml de fenol al 5%)
- Se tiñen por diez minutos con la solución de carbol fuscina diluida 1:10.
- Se enjuagan en agua corriente.
- Se diferencian con solución al 0.5% de ácido acético por no más de 30 segundos.
- Se enjuagan.

- Se aplica la tinción de contraste: azul de metileno al 1% por 20 segundos.
- Los cortes se deshidratan, aclaran y montan en resina o DPX.
- Las *Brucella* tienen forma cocoide o cocobacilar y se tiñen de color rojo contra un fondo azul.
- En frotis de placentas, las *Brucella* a menudo se encuentran en grupos rojos dentro de células trofoblásticas teñidas de azul.
- Debe recordarse que las *Chlamydia* también se tiñen de rojo con la técnica de Stamp y son muy difíciles de diferenciar de *Brucella* a la observación al microscopio. Es conveniente contar con laminillas teñidas de referencia de ambos microorganismos.
- Los casos positivos por tinción deben confirmarse mediante cultivo.

Tinción de Köster

La coloración descrita por Köster y modificada por Christoffersen y Ottosen en 1941 se puede emplear en frotis, improntas o cortes hidratados.

- Los frotis se secan y fijan a la flama de un mechero.
- Se utiliza una mezcla recién preparada de dos gotas de solución acuosa saturada de safranina y cinco gotas de solución de hidróxido de potasio 1M.
- Se tiñen por uno a dos minutos.
- Se enjuagan en agua estéril.
- Se diferencian dos veces con solución al 0.1% de ácido sulfúrico, por un tiempo total de 10 a 20 segundos.
- Se enjuagan.
- Se aplica la tinción de contraste (a elegir):
 - azul de metileno al 1% por 20 segundos.
 - azul de metileno carbol (azul de metileno 1g, etanol absoluto 10 ml y 100 ml de solución acuosa de fenol al 5%) por dos a tres segundos.

- Las *Brucella* tienen forma cocoide o cocobacilar y se tiñen de color naranja rojizo contra un fondo azul.
- En frotis de placentas, las *Brucella* a menudo se encuentran en grupos rojos dentro de células trofoblásticas teñidas de azul.
- Los *Staphylococcus* y otras bacterias se observan de color azul.
- Los casos positivos por tinción deben confirmarse mediante cultivo.

AZUL DE TOLUIDINA

Esta tinción permite observar la metacromasia de los gránulos de las células cebadas, por ejemplo, en los mastocitomas. Por su facilidad y rapidez de preparación, también se emplea para teñir cortes semifinos, para evaluar los bloques y fracciones de estos antes de hacer los cortes finos para microscopía electrónica.

Las improntas o frotis se fijan en formalina al 10% en solución amortiguada de fosfatos (véase la página 45 del capítulo preparación de soluciones).

Se prepara una solución de azul de toluidina al 0.5%, disolviendo 0.5 g de polvo de azul de toluidina⁵³ en 100 ml de agua destilada.

Los cortes se desparafinan e hidratan.

Se mantienen en agua por 5 minutos.

Se tiñen en la solución de azul de toluidina por 5 a 20 minutos. (Se prefieren 5 minutos para demostrar las células cebadas).

Se dan enjuagues rápidos en etanol 96%, dos series de 10 sumergidas.

Se cambia a etanol absoluto, dos tinas de un minuto c/u.

Se aclaran y montan.

Los gránulos de las células cebadas y otras estructuras metacromáticas se observan de color rojo - morado.

⁵³ C.I. 52040.

Debe recordarse que la cantidad de células cebadas que pueden demostrarse en un corte depende del tipo de fijador que se utilizó. Los fijadores ácidos fuertes (Bouin, Zenker) ponen de manifiesto una población adicional de células cebadas que no son observables en las piezas fijadas en formalina al 10%, por ejemplo, en intestino y bronquios.

TÉCNICA DE VON KOSSA PARA SALES DE CALCIO

La técnica de VonKossa permite demostrar depósitos de calcio (y magnesio y otros metales como reacción cruzada), pero es bastante laboriosa, por lo que no es tan popular como en patología humana, donde la calcificación distrófica asociada a la patología del envejecimiento es tan frecuente.

Se prepara una solución alcohólica de hidróxido de potasio:

KOH..... 0.05 g
etanol absoluto 100.00 ml

Se prepara una solución de nitrato de plata al 5%:

nitrato de plata 5 g
agua destilada..... 100 ml

Se prepara una solución de tiosulfato de sodio al 0.25%:

tiosulfato de sodio..... 0.25 g
agua destilada..... 100.00 ml

Se tiene una solución de **Hematoxilina de Ehrlich**, añejada (almacenada en oscuridad) por 6 meses o más.

hematoxilina⁵⁴ 12.8 g
etanol absoluto 644.0 ml
agua destilada 644.0 ml
sulfato de potasio y
aluminio 80.0 g
glicerina 644.0 ml

ácido acético glacial .. 64.0 ml
yodato de sodio..... 3.56 g

De esta solución concentrada se añaden 20 ml a 180 ml de agua destilada.

Se prepara una solución acuosa saturada de carbonato de litio, de esta se añaden 10 ml a 180 ml de agua destilada

Se prepara una solución concentrada de **floxina B⁵⁵**:

floxina B 20 g
agua destilada 200 ml

Se añaden 7 ml de esta solución concentrada a 193 ml de formalina al 10%.

Se llevan los cortes a etanol 96%. Se dan 5 sumergidas en alcohol absoluto y 5 sumergidas en etanol 96%. Se ponen 3 minutos en hidróxido de potasio 0.05%. Se pasan a etanol 70% por 3 minutos, para luego darles 15 sumergidas en etanol 50%. Se enjuagan en agua por 3 minutos, y luego tres enjuagues en agua destilada, sumergiéndolas diez veces en cada recipiente.

Se ponen en la solución de nitrato de plata por 5 a 10 minutos expuestos a luz ambiente; para pulmón se usan 10 minutos, para riñón 5 minutos, y para aorta de 5 a 10 minutos.

Se pasa la caja con laminillas y solución a luz solar directa o lámpara de 200 a 500 watts (a más de 50 y menos de 75 cm. de distancia) por 5 a 10 minutos.

Se dan 5 series de 10 sumergidas en agua destilada. Se ponen en solución de tiosulfato por cinco minutos, agua cinco minutos, hematoxilina de Ehrlich por diez minutos, agua dos minutos, carbonato de litio un minuto, agua cinco minutos, floxina B dos y medio minutos y diez sumergidas en agua destilada. Se deshidratan, aclaran y montan.

⁵⁴ C.I. 75290.

⁵⁵ Phloxine, cianosina, eosina 10 B, C.I. 45410.

BLANQUEADO DE MELANINA

En aquellas circunstancias en que se requiera comprobar la identidad de pigmento compatible con melanina, se puede blanquear ésta con solución de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), del mismo modo como se destiñen el cabello algunas mujeres. También puede emplearse la siguiente técnica (Johnson, 1995) que destiñe melanina y lipofucsina:

- Los cortes se desparafinan e hidratan.
- Se colocan en una solución de permanganato de potasio al 0.25 % por 5 minutos o más.
- Enjuague en agua.
- Tratamiento con solución de ácido oxálico al 5 % por 5 segundos o más.
- Enjugue.
- Coloración habitual HE.

En algunos melanomas, es tal la cantidad de pigmento, que se oculta por completo la estructura de las células. Para poder evaluar las estructuras intracelulares resulta conveniente el aclarar los cortes.

LECTURAS RECOMENDADAS

Las siguientes referencias pueden servirle al lector interesado en ampliar la información sobre coloraciones para histología:

- Carter, G. R.: *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. Charles C. Thomas, Illinois, U. S. A., 1979.
- Culling, C. F. A.: *Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques*. Butterworths, London, 1974.
- Haas, E.: *50 Diagnostic Special Stains for Surgical Pathology*. J. B. Lippincott, Philadelphia, U. S. A., 1981.
- Johnson, F. B.: *Pigmentos y Minerales*, en: Prophet, E. B; Mills, B; Arrington, J. B; Sobin, L. H.: *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas, Registro de Patología de los Estados Unidos de América, Washington, D. C., 1995.
- Prophet, E. B; Mills, B; Arrington, J. B; Sobin, L. H.: *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas, Registro de

Patología de los Estados Unidos de América, Washington, D. C., 1995.

Cuadro 10. TINCIONES ESPECIALES DE UTILIDAD EN HISTOPATOLOGÍA.		
<i>Técnica</i>	<i>Para detectar</i>	<i>Resultado positivo</i>
Ácido peryódico de Schiff (PAS) {página 67}	mucinas neutras, membrana basal, muco y glicoproteínas, hongos, amibas	rojo
PAS con diastasa	glucógeno	PAS negativo
Ácido rubiánico	cobre	verde oscuro
Alizarina roja S	calcio	rojo birrefringente
Auramina O {página 69}	<i>Mycobacterium, Nocardia</i> {pág 68}	verde (fluorescente)
Azul Alciano pH 2.5	mucina ácida, ácido hialurónico	azul
Azul Alciano - PAS	cartílago, mucopolisacáridos ácidos y neutros	azul (ácidos), rojo - magenta (neutros)
Azul de algodón lactofenol	hongos	azul
Azul de Prusia	hierro	azul
Azul de toluidina {página 71}	células cebadas	violeta (metacromasia)
Azul escarlata de Martius	fibrina	rojo
Carbonato de litio de Ortega	astrocitos	café
Carmín de Best	glucógeno	rojo
Cristal violeta de Lieb	amiloide	violeta - púrpura
Duun Thompson	hemoglobina	rojo
Feulgen	ADN	rojo a morado
Fite - Faraco	<i>Nocardia, Mycobacterium</i>	magenta - rojo púrpura
Fontana Masson	melanina, células argentafines	café - ocre - negro
Fouchet	pigmentos biliares	azul
Fucsina aldehído	insulina	rojo
Giemsa {p 65}	eosinófilos, células cebadas, protozoarios	<i>ver texto</i>
Gomori metenammina plata (GMS)	hongos (<i>Blastomyces</i>), membrana basal	negro
Gram {página 66}	bacterias	azul (+), rojo (-)
Gridley	<i>Aspergillus, Histoplasma, Blastomyces, Cryptococcus</i>	púrpura
Grimelius	gránulos neuroendócrinos	café
Grocott metenammina plata	hongos, amibas	negro
Hall	bilirrubina	oliva - verde esmeralda
Hierro coloidal - PAS	mucinas ácidas y neutras	azul (ácidas), rojo (neutras)
Holmes	axones	negro - café
Jones methenammina plata	membrana basal	café
Köster {página 71}	<i>Brucella</i>	rojo, naranja rojizo
Lendrums floxina tartraxina	cuerpos de inclusión	rojo
Levaditi	espiroquetas, <i>Leptospira</i>	café ocre
Luxol azul resistente ("rápido")	mielina	azul - verde
Macchiavello	<i>Rickettsia, Chlamydia</i>	azul
Mallory	hemosiderina	azul
Mann {página 152}	cuerpos de inclusión en rabia	rojo bermellón
Metil verde pironina	ARN de células plasmáticas	rojo

Nueva fucsina {página 69}	bacterias ácido-alcohol-resistentes	rojo
Orceína ácida - Giemsa	hongos, células cebadas	azul
Papanicolau	detalle celular, queratina	naranja densa (queratina)
Pasqual	células argirofílicas	café negro
Perls	hemosiderina	azul
Pearse	lipofucsina	rojo
Protargol de Bodian	neurofibrillas y axones	negro - café ocre
PTAH (hematoxilina y ácido fosfotúngstico)	músculo, fibrina	rojo (músculo), rojo ladrillo (fibrina)
PVK	<i>Chlamydia</i>	rojo
Reticulina de Gridley	fibras de reticulina, mucina, <i>Blastomyces</i>	café negro a púrpura profundo
Rodanina	cobre	rojo
Rojo congo	amiloide (cortes de 12 µm de grosor)	verde manzana bajo luz polarizada
Rojo Congo - permanganato de potasio	amiloide primario y secundario	verde manzana bajo luz polarizada (primario)
Rojo oleoso O	grasas (cortes congelados)	rojo
Schultz	colesterol	azul a verde
Seller {página 151}	cuerpos de inclusión en rabia	rojo púrpura con granos azul oscuro
Stamp {página 70}	<i>Brucella, Chlamydia</i>	rojo
Sudán	lípidos	amarillo a naranja
Tinta china o nigrosina (impronta fresca)	cápsula de <i>Cryptococcus neoformans</i>	sin teñir, movimiento browniano (<i>in vivo</i>)
Tioflavina S	cuerpos de inclusión en rabia	azul oscuro (fluorescente)
Tricrómica de Masson	colágena, músculo, queratina	azul (colágena), rojo (músculo, queratina)
Tricrómica de Pollack	hipófisis	acidófilas, basófilas, cromóforas
Van Giesson	colágena	rojo
Verde metil pironina	ADN y ARN	ADN azul, ARN rojo
Verhoeff	fibras elásticas	negro - café ocre
Violeta de cresilo de Vogt	sustancia de Nissl	púrpura intenso
Von Kossa {página 72}	calcio	negro
Warthin - Starry	espiroquetas, <i>Leptospira, Campylobacter, Bacillus pilliformis</i>	café ocre
Ziehl - Neelsen {página 68}	bacterias ácido-alcohol-resistentes, <i>Nocardia asteroides</i> {página 68}	rojo
Ziehl - Neelsen modificado	células cebadas, plomo, lipofucsina	rojo, café (lipofucsina)

Inmunohistoquímica elemental

Beatriz Vanda Cantón

Introducción

Usos

Limitaciones

Ventajas de la IP sobre inmunofluorescencia

Recuperación de antígenos ocultos o dañados por sobrefijación

Métodos

Peroxidasa Anti Peroxidasa

Complejo Avidina Biotina Peroxidasa

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

Las tinciones de inmunohistoquímica se basan en la detección de antígenos en células y tejidos, mediante anticuerpos específicos marcados con una enzima, que cuando se expone a su sustrato en presencia de un cromógeno, el sitio de reacción antígeno-anticuerpo se puede visualizar a través del microscopio óptico. Una de las técnicas de inmunohistoquímica más empleada es la inmunoperoxidasa (IP) y la reacción se hace evidente al tratarse con peróxido de hidrógeno y un cromógeno.

El color de la reacción depende del cromógeno que se utilice, que en el caso de la inmunoperoxidasa (IP) pueden ser:

- diaminobencidina⁵⁶ (DAB), ésta se observa como gránulos café - ocre cuando es positiva.
- 3-amino-9-etil carbazol⁵⁷ (AEC), se observa como gránulos rojos.

⁵⁶ SIGMA D-5905.

Si la enzima con la se marca es **fosfatasa alcalina**, el cromógeno con que se revela puede ser:

- nueva fucsina⁵⁸, se observa de color fucsia o rojo
- nitro azul de tetrazolio⁵⁹, se observa de color azul morado, o
- rojo resistente RC (*fast red rc*, “rojo rápido”) ⁶⁰, se observa de color fucsia o rojo.

USOS

El uso de las inmunotinciones ha sido de gran ayuda en medicina e investigación, y se ha empleado para:

- Diagnóstico de enfermedades autoinmunes.
- Determinación de la estirpe histológica de neoplasias (*véanse el cuadro 11 en la página 1 y el capítulo de la página 97*).
- Clasificación de los diferentes subtipos de linfocitos.
- Identificación de agentes infecciosos como virus, bacterias, parásitos y hongos.

LIMITACIONES

Por una parte, muchos de los antígenos a ser detectados por IP se encuentran altamente conservados entre las diferentes especies de mamíferos domésticos y tienen una estructura antigénica similar o idéntica.

Por otra parte, cambios pequeños en la secuencia de aminoácidos, o en la glicosilación de proteínas, pueden ser suficientes para que un anticuerpo que reconoce una molécula determinada en tejidos de humano no reconozca a la proteína correspondiente del perro, bovino u otras especies. Por ejemplo: los antiseros usuales para proteína S-100, que son

⁵⁷ SIGMA A-6926.

⁵⁸ C.I. 42520, violeta básico 2.

⁵⁹ SIGMA N-5514.

⁶⁰ Es importante no confundir el rojo resistente rc (*fast red*, C.I. 37085, SIGMA F-5146 F-4648) sustrato para fosfatasa, con el rojo resistente nuclear (*nuclear fast red*, C.I. 60760), usado en la determinación de calcio.

muy útiles para identificar el tipo de neoplasia en humanos, no funcionan en tumores de perros.

Esta característica debe investigarse para los diferentes anticuerpos disponibles para IP.

Finalmente, debe recordarse que los diferentes antisueros para el mismo antígeno, fabricados por diferentes compañías, no necesariamente reconocen el mismo epítopo.

VENTAJAS DE LA IP SOBRE LA INMUNOFLUORESCENCIA

Algunas de las ventajas que tiene la IP sobre la inmunofluorescencia (IF), es que puede utilizarse en tejidos fijados en formalina al 10% e incluidos en parafina; aunque lo ideal es trabajar con muestras frescas en cortes por congelación, o bien fijados en paraformaldehído al 2%, con el fin de que el fijador no desnaturalice proteínas ni "enmascare" los determinantes antigénicos, que muchas veces son la causa de que la reacción sea débil o escasa.

Interesantemente, el líquido fijador de Bouin (*página 47*) puede ser un buen fijador para inmunohistoquímica de algunos antígenos. La formalina con cloruro de mercurio (*página 48*) ha sido empleada como fijador para la demostración de inmunoglobulinas en cortes (Jones & Gregory, 1989), pero requiere que se eliminen los cristales de cloruro de mercurio de los cortes (*véase la página 48*) antes de hacer el proceso de inmunoperoxidasa..

Otra ventaja de la IP es que para su observación no se requiere un microscopio de epi-fluorescencia, sino que se utiliza el microscopio de luz; además la duración de la reacción es permanente, lo que permite guardar las laminillas a temperatura ambiente, durante años, para estudios posteriores, consulta, fotografía o como material de referencia, a diferencia de la IF donde la fluorescencia sólo se observa de manera efímera.

RECUPERACIÓN DE ANTÍGENOS OCULTOS O DAÑADOS POR SOBRE-FIJACIÓN

Cuando existe muy poco antígeno intacto o se teme que esté dañado por la fijación con formaldehído y no pueda ser detectado, puede emplearse:

- Alguno de los "recuperadores de antígenos" comerciales ^{61 62}.
- Incubación por 20 a 40 minutos en solución amortiguadora de citratos 0.01 M, pH 6 a 95°C.
- Enzimas proteolíticas: tripsina, proteasas y pepsina.

La tripsinización usualmente es con tripsina al 0.1% disuelta en un amortiguador Tris salino de pH 7.8 con 0.1% de cloruro de calcio. Los cortes desparafinados e hidratados se colocan en esta solución de tripsina a 37 °C de 10 a 60 minutos.

Las solución de proteasa (SIGMA tipo XXIV) al 0.05% en solución de amortiguador Tris de pH 7.4 a 37 °C por 30 a 60 minutos es más fuerte que la tripsinización. Se utilizan concentraciones de proteasa desde 0.05% hasta 0.5%, dependiendo de la fijación que se haya empleado.

El exceso de tratamiento con enzimas proteolíticas daña la morfología celular y puede causar que los cortes se desprendan de las laminillas.

MÉTODOS

Existen dos métodos diferentes para realizar la IP con excelentes resultados:

- I. El método de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), que comprende un anticuerpo primario dirigido contra el antígeno que se desea detectar, un anticuerpo secundario contra el primero (que sirve de "puente") y la molé-

⁶¹ *Antigen Retrieval, BioGenex*, Fax USA 510-275-1999.

⁶² *Target Retrieval Solution*. # catálogo S3307, DAKO Corporation.

cula de PAP que consta de 2 inmunoglobulinas y 3 peroxidasa.

Peroxidasa - AntiPeroxidasa

1. Desparafinar las laminillas en la estufa a 60 °C/ 30 minutos. Rehidratarlas en xilol (10 minutos) y luego en alcohol absoluto y alcohol 95%.
1. Enjuagar en agua o en *buffer* salino (pH 7.5). 5 minutos
1. Incubar en metanol absoluto y H₂O₂ al 3%, durante 5 minutos (para bloquear la peroxidasa endógena).
1. Lavar con agua destilada y/o *buffer* salino de fosfatos (*PBS*) (5 minutos)
1. Incubar con suero normal de la especie en donde se produjo el anticuerpo secundario, para bloquear reactividad inespecífica de antígenos tisulares. (10 a 30 minutos)
1. Decantar el exceso de suero.
1. Colocar sobre el corte unas gotas del anticuerpo primario (a la dilución recomendada), e incubar en una cámara húmeda (por 20-60 minutos) a temperatura ambiente.
1. Lavar con *PBS* (5-10 minutos)
1. Incubar con el anticuerpo secundario (20-30 minutos)
1. Lavar con *PBS* (5-10 minutos)
1. Colocar unas gotas del complejo PAP (de conejo o ratón), el anticuerpo debe diluirse al momento de usarse, ya que la solución es inestable. Incubar de 20 a 30 minutos.
1. Lavar con *PBS* de 5 a 10 minutos.
1. Incubar con diaminobencidina (cromógeno) con H₂O₂ al 30% (sustrato de la peroxidasa), al reaccionar, se libera oxígeno, el cual oxida a la diaminobencidina y colorea la reacción. Un revelado adecuado toma de 10 a 15 minutos.
1. Lavar en agua destilada para detener la reacción.
1. Contrastar con hematoxilina de Harris para obtener una tinción nuclear; deshidratar de manera ordinaria y montar con resina.

Laminillas controles

Al testigo o control negativo, no se le agrega el anticuerpo primario, sino suero normal de conejo.

El control positivo se hace con un corte de tejido en el que de antemano se sepa que la reacción resultará positiva.

Complejo Avidina - Biotina peroxidasa

- II. El método del complejo avidina-biotina peroxidasa (*ABC*), que aprovecha la gran afinidad que tiene la avidina para unirse a cuatro moléculas de biotina, por lo que se usa un anticuerpo primario, uno secundario conjugado con biotina y el complejo de tres peroxidasa unidas a avidina y biotina.

La técnica es similar a la descrita para el PAP hasta el paso número 8.

9. Incubar con el anticuerpo secundario biotinizado (universal) diluido en *PBS* conteniendo suero bloqueador (10-30 minutos).
10. Lavar en *PBS* 5 minutos.
11. Incubar con la solución del complejo avidina-biotina-peroxidasa de 5 a 30 minutos. La reacción es aún más intensa si se emplea estreptavidina en lugar de avidina.
12. Lavar en *PBS* 5 minutos.
13. Incubar con la solución sustrato de peroxidasa que contiene el cromógeno (H₂O₂ con diaminobencidina), y vigilar la reacción para detenerla cuando se obtenga la intensidad de color deseada.
14. Lavar en agua destilada para detener la reacción.
15. Contrastar con hematoxilina de Harris para obtener una tinción nuclear; deshidratar de manera ordinaria y montar con resina.

LECTURAS RECOMENDADAS

Rodríguez H A, Gómez A M, Orozco H, Alcántara A, Cruz H: La inmunoperoxidasa: generalidades y evaluación de 500 casos. *Rev. Fac. Med. UNAM* 29:155-166, 1986.

Haines D M y Chelack B J: Technical considerations for developing enzyme immunohisto-

chemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn Invest.* 3:101-112, 1991.

Jones E L & Gregory J: *Immunoperoxidase methods*. In: Catty D (editor): *Antibodies*. Volume II, pp 155-177. Oxford University Press, Oxford, U. S. A. 1989

Biología molecular

María de Lourdes Segura Valdés

Julia Pérez Ramos

Luis Felipe Jiménez García

Introducción

Usos

Hibridación *in situ*

Marcado de la sonda

Procedimiento de hibridación

PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

PCR *in situ*

Otras técnicas especializadas

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describen dos de las técnicas de la biología molecular moderna que se emplean como herramientas diagnósticas para la detección *in situ* de ácidos nucleicos específicos: la hibridación de ácidos nucleicos y la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR** = *Polimerase Chain Reaction*). Ambas técnicas se basan en la capacidad de los ácidos nucleicos de aparearse dependiendo de la complementaridad entre sus secuencias de bases, y permiten la detección de secuencias de ácidos nucleicos específicos y su visualización por medio de la microscopía de luz, fluorescente o electrónica.

USOS

Tanto la hibridación como la *PCR in situ* permiten la detección de la presencia o ausencia de un gen específico, de alguna mutación genética del ácido desoxirribonucleico (ADN) y/o la expresión de alguno de éstos

(cuando lo que se detecta es ARN mensajero) dentro de un tejido o en extendidos de cromosomas metafásicos. Estas técnicas son herramientas poderosas en el diagnóstico temprano de algunas enfermedades, en el diagnóstico prenatal o bien, en la detección de microorganismos (virus, *Mycoplasma*, etc.).

HIBRIDACIÓN *IN SITU*

En 1969, Joseph Gall y Mary Lou Pardue inventaron la técnica de hibridación *in situ*. Con esto, se tuvo la oportunidad de visualizar los ácidos nucleicos a nivel subcelular. La hibridación *in situ* se desarrolla a partir de los principios que se siguen en la hibridación en filtros (*Southern blot* y *Northern blot*).

Todas las metodologías que emplean el proceso de hibridación de ácidos nucleicos comprenden básicamente el uso de un fragmento de ADN de una sola cadena, una cadena de oligonucleótidos o una de ARN (Ácido RiboNucleico) marcada específicamente (la **sonda**), la cual reacciona y se une con su cadena complementaria de ADN (ADNc) o de ARN. Los híbridos son visualizados utilizando métodos de detección que reconocen específicamente la marca sobre la **sonda**.

Las **sondas** pueden ser obtenidas comercialmente, clonadas a partir de ADN genómico, en un equipo sintetizador de oligonucleótidos, o bien por transcripción *in vitro* a partir de una secuencia de ADNc.

Marcado de la sonda

Independientemente de los métodos de obtención de la sonda y de hibridación, uno de los requerimientos imprescindibles de esta técnica es el marcado de la sonda. En la actualidad se prefieren los métodos no radiactivos, por ser más seguros, más rápidos y permitir mayor capacidad de resolución en la detección.

Los métodos de marcado más utilizados en la actualidad para el caso de **sondas** de ADN son: el llamado de “*Nick Translation*” (translación de muesca) y el de “*Random*

Primer" (iniciador aleatorio). Ambos métodos involucran la incorporación al azar de nucleótidos marcados por medio de la acción de una enzima ADN polimerasa. Tanto las secuencias de oligonucleótidos como las **sondas** de ARN ("riboprobes") se marcan al momento de ser sintetizadas.

Las sustancias más utilizadas para marcar sondas son la biotina y la digoxigenina, ya que pueden ser detectadas de diferentes maneras: por el desarrollo de compuestos cromógenos o con complejos de fluorocromos.

Cuando se requiere de una preparación permanente se recomienda el uso de cromógenos; y los cromógenos que permiten el mejor contraste en combinación con la tinción de contraste con hematoxilina⁶³, son el rojo resistente (*fast red*, rojo "rápido")⁶⁴ y la nueva fucsina.

Procedimiento de hibridación *in situ*

El procedimiento que a continuación se describe considera que este manual es consultado principalmente por patólogos y que sus muestras fueron procesadas por inclusión rutinaria en parafina (véase la página 58):

1. **OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.** En general en patología se trabaja con muestras que han sido procesadas por métodos convencionales; sin embargo, si se tiene la posibilidad, se recomienda fijar las muestras en solución de paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (*PBS*, véase la página 45).
1. **DESPARAFINAR Y REHIDRATAR**, por métodos convencionales, los tejidos cortados a 3 o 4 μm de grosor y montados en portaobjetos tratados con silano o cualquier otra mezcla que asegure la adhesión (véase la página 64 del capítulo de histopatología).
1. Enjuagar en amortiguador de fosfatos 5 minutos.

⁶³ La tinción de contraste no debe enmascarar la marca positiva.

⁶⁴ Comercialmente disponible de diferentes compañías.

1. **TRATAMIENTO CONTRA SOBRE - FIJACIÓN.** Si las muestras fueron procesadas rutinariamente y es posible que se hayan sobre fijado, será necesario incubar por 20 a 40 minutos en solución amortiguadora de citratos 0.01 M, pH 6 a 95 °C, o utilizar un recuperador de antígenos para inmunohistoquímica comercial⁶⁵.

1. Dejar enfriar por 20 minutos a temperatura ambiente.

1. Enjuagar en *PBS*.

1. **HIBRIDACIÓN.** Incubar con la sonda marcada (diluida en solución de hibridación, la cual existe de manera comercial de diferentes marcas) a 42°C por toda la noche.

1. Enjuagar en *PBS*.

1. **REVELADO.** Este paso depende del tipo de marca:

- **BIOTINA.** Se revela empleando complejos combinados con avidina o estreptavidina o con el anticuerpo anti - biotina. Los complejos involucran a una molécula de algún fluorocromo (fluoresceína, rodamina, etc.); o bien, una enzima desarrolladora de color (peroxidasa o fosfatasa alcalina).
- **DIGOXIGENINA.** En este caso sólo pueden emplearse los complejos de fluorocromo o enzima combinados con el anticuerpo anti - digoxigenina.

Cuando se revele con complejos combinados con anticuerpos se puede seguir el protocolo descrito en el capítulo de inmunohistoquímica (véase la página 87) a partir de la incubación con el primer anticuerpo.

Para el desarrollo del color se siguen las recomendaciones del fabricante.

1. **TINCIÓN DE CONTRASTE.** La tinción contrastante no debe enmascarar la marca positiva, por lo que usualmente se emplea

⁶⁵ *Antigen Retrieval, BioGenex*, Fax USA 510-275-1999.

Target Retrieval Solution. # catálogo S3307, *DAKO Corporation*.

un solo colorante; por ejemplo, si se utilizó fosfatasa alcalina se empleará:

- hematoxilina acuosa (véase la página 65) para contrastar al rojo resistente⁶⁶ (*fast red*, rojo “rápido”), a la nueva fucsina y a la diaminobencidina (*DAB*);
- eosina acuosa (véase la página 65) para contrastar al nitro azul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (*NBT/BCIP*).

1. **MONTAR Y OBSERVAR AL MICROSCOPIO.** Algunos cromógenos son muy solubles en alcohol, por lo que será necesario montar el cubreobjetos con algún medio de montaje acuoso⁶⁷.

PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

La reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) es una técnica que se emplea para copiar una secuencia específica de ADN a partir de un molde o templado iniciador (*primer*) y amplificarla hasta más de 10^9 veces en sólo unas horas. La *PCR* es un método sintético enzimático cíclico, en el que en cada ciclo, el número de dobletes de ADN se duplica. Los dobletes se separan con calor, se les permite enfriarse para que se unan los templados a ellos y la polimerasa de ADN extienda los templados por la adición de nuevos nucleótidos.

Este método puede llevarse a cabo gracias al descubrimiento de la Taq Polimerasa I, una enzima que se aísla de una bacteria acuática termófila que vive en las aguas termales del parque nacional de Yellowstone en EE.UU. Esta enzima tiene como característica principal que su temperatura óptima para la polimerización del ADN es entre 70°C y 72°C, lo que permite que las secuencias de

ADN puedan ser incubadas a temperaturas de desnaturalización del doblete de ADN, su enfriamiento permite la re-naturalización para la alineación de los templados y la síntesis de ADN por la polimerasa, todo en el mismo tubo, por varios ciclos de cambios de temperatura; todo esto sin que la enzima pierda su actividad. El avance de esta técnica en la actualidad ha sido vertiginosa; recientemente han sido descubiertas otras enzimas termoestables y existen en el mercado una gran cantidad de reactivos en paquete o “*kits*”, para hacer más simple y eficiente el proceso.

Los templados o iniciadores son el segundo requisito más importante de la *PCR*, después de la Taq ADN polimerasa. Estos iniciadores son diseñados dependiendo de la secuencia que se desea amplificar; en la actualidad el diseño se realiza por computadora. De entre las características más importantes de estos iniciadores están:

- deben ser complementarios a una secuencia específica.
- las moléculas deben ser de una sola hebra y se requieren al menos dos iniciadores.
- típicamente deben tener de 18 a 28 bases de nucleótidos.
- no deben incluir palíndromos (que se leen igual al derecho y al revés) en su secuencia.

PCR *in situ*

La correlación directa del análisis de ácidos nucleicos junto con la observación histopatológica es la ventaja clave de la hibridación *in situ*; sin embargo, esta técnica está limitada por sus niveles moderados o bajos de sensibilidad. Por otra parte, se requiere la extracción del ADN previamente al procedimiento de la *PCR*, lo que no permite la localización subcelular del producto amplificado por *PCR*. La *PCR in situ* consiste en la combinación de ambas técnicas; es decir, el proceso cíclico enzimático, por medio del cual se incorporan nucleótidos marcados (con digoxigenina, por ejemplo) directamente al producto amplificado. Se lleva a cabo en la muestra, permitiendo la detección

⁶⁶ Es importante no confundir el rojo resistente (*fast red*) con el rojo resistente nuclear (*nuclear fast red*), pues son dos colorantes diferentes.

⁶⁷ *Glycergel*, DAKO Corporation.

de la señal amplificada en células fijadas, ya sea en cortes histológicos, células en monocapa, etc. A continuación se describe el procedimiento:

1. **TIPOS DE MUESTRA.** Cortes histológicos montados en portaobjetos silanizados (véase la página 64), desparafinados y rehidratados; células montadas y fijadas en el mismo tipo de portaobjetos.
1. Sobre las laminillas se colocan 7.5 µl de la solución de amplificación que contiene:
 - solución amortiguadora de amplificación (existe de manera comercial)
 - solución 4.5 mM de MgCl₂
 - 1 µM de cada iniciador
 - 200 µM de dNTPs
 - 10 µM de digoxigenina-11-dUTP
1. Se cubre la preparación con cubreobjetos de plástico y se sella con barniz de uñas.
1. Las laminillas se colocan sobre una “barca” de papel aluminio y se ponen en contacto directamente con el bloque de calentamiento del termociclador.
1. **ARRANQUE EN CALIENTE MANUAL.** Cuando la temperatura ha alcanzado los 65°C, se levanta parcialmente el cubreobjetos y se agregan 2.5 µl de la solución de amplificación que contiene dos unidades de la *Taq* ADN polimerasa.
1. Las laminillas son cubiertas con aproximadamente un ml de aceite mineral previamente calentado a 82°C.
1. Se realiza un primer paso de desnaturalización a 94°C por tres minutos.
1. **AMPLIFICACIÓN.** Se completan 20 ciclos de la siguiente manera:
 - alineación extensión a 55°C por 2 minutos y
 - desnaturalización por un minuto a 94°C.
1. El aceite mineral se remueve con xilol y éste se elimina a su vez con un lavado en etanol al 100%.
1. La **DETECCIÓN** de digoxigenina se lleva a cabo con el anticuerpo anti - digoxigenina

acoplado a una enzima reveladora de color como la fosfatasa alcalina y se **REVELA** con algún cromógeno como el rojo resistente (*fast red*, rojo “rápido”).

1. Cuando se utiliza el rojo resistente como cromógeno, las preparaciones se contrastan con tinción de hematoxilina acuosa (véase la página 65) y los cubreobjetos se montan con medio de montaje acuoso⁶⁸.

OTRAS TÉCNICAS ESPECIALIZADAS

Es posible realizar la detección de secuencias de ácidos nucleicos de bajo número de copias por medio de la *PCR in situ*, dada la gran potencialidad de la técnica de amplificar la señal. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes, tales como resultados falsos positivos y la necesidad de reactivos y equipo especializados, lo que hace que sea una técnica muy costosa.

Actualmente se está desarrollando una técnica que permite la amplificación de la señal basada en la formación del complejo Avidina - Biotina - Peroxidasa y revelado con DAB. Esta técnica involucra una reacción catalizada por peroxidasa, que produce el depósito de un compuesto fenólico biotinado (biotinil tiramida) y una segunda reacción con peroxidasa. El protocolo⁶⁹ que se sigue para esta técnica es similar al que se ha descrito previamente para hibridación *in situ*, con la diferencia de un paso extra al momento de la detección, para agregar el compuesto biotinil tiramida.

LECTURAS RECOMENDADAS

Gall, G. and Pardue, M. L. Formation and detection of ARN-ADN hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63: 378-381, 1969

⁶⁸ *Glycergel*, DAKO Corporation.

⁶⁹ Este procedimiento se puede llevar a cabo con “kits” comerciales.

- Kendrew, S.J. (Editor in Chief): *The Encyclopedia of Molecular Biology*. Blackwell Science. Cambridge MA. U.S.A, 1994.
- Mullis, K.B: The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.* 56-65, April 1990
- Mullis, K.B. , Faloona, F., Scharf, S., Horn, G. and Ehrlich, H. Specific Enzymatic amplification of ADN *In Vitro*: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology LI* : 263-273, 1986.
- Nuovo, , G.J., Gallery, F., Hom, R., Phyllis, M. C. and Bloch, W. Importance of Different Variables for Enhancing In Situ Detection of PCR-amplified ADN. *PCR. Methods and Applications 2(4)* : 305-312, 1993.
- Polak, J.M. and Mc Gee, J. O'D. (Eds.): *In Situ Hybridization. Principles and Practice*. Oxford University. Press. New York. U.S.A, 1990.
- Segura V., M. de L.. *Disección Molecular del Nucleolo in situ. Visualización de Acidos Nucleicos Nucleolares por Hibridación in situ Fluorescente y Ultraestructural* Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias U.N.A.M., 1996.

Diagnóstico de neoplasias de piel y tejidos blandos

Eugenia Candanosa Aranda

Beatriz Vanda Cantón

Introducción

Criterios macroscópicos de malignidad

Criterios microscópicos de malignidad

Clasificación de neoplasias

Neoplasias epiteliales

Neoplasias mesenquimatosas

Neoplasias de células redondas

Melanomas

Inflamación y neoplasias

Diagnóstico citológico

Diagnóstico histológico

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

Debido a que una de las tres principales causas de muerte en perros y gatos adultos son las neoplasias, es necesario que día a día los métodos diagnósticos sean más eficientes.

En estudios hechos en México, de 3563 casos citológicos, 835 casos (23 %) fueron diagnosticados como neoplasias. Por otro lado, de 571 perros remitidos para diagnóstico, 83 % presentaron neoplasias.

En el cuadro 11 (*página 1*) se mencionan algunas de las neoplasias de tejidos blandos más frecuentes en los animales domésticos.

El médico clínico requiere de un diagnóstico rápido y certero, para así poder tomar una decisión terapéutica. Por otro lado, el patólogo veterinario con frecuencia se enfrenta con neoplasias tan indiferenciadas, que con las tinciones de rutina no puede determinar su

estirpe histológica y tiene que recurrir a otras técnicas diagnósticas.

Para realizar un adecuado diagnóstico de neoplasia es necesario contar con una historia clínica completa, estudios de laboratorio y examen físico. La información de edad, sexo y especie del paciente es de gran importancia, debido a que hay neoplasias que se presentan en perros jóvenes, como el histiocitoma, o neoplasias asociadas al sexo, como el tumor de glándula mamaria en perra y gata. Los estudios de laboratorio proporcionan información sobre el estado fisiológico del paciente; además en la mayoría de los casos es útil recurrir a la placa radiográfica, tomografía o ultrasonido, para delimitar el área afectada y las posibles metástasis. En los procesos malignos es posible auxiliarse de la angiografía.

A la fecha, se cuenta con numerosos métodos diagnósticos entre los que se pueden mencionar: ultrasonido, tomografía axial computarizada, angiografía, enzimología, hematología, microscopía electrónica (*página 104*), anticuerpos monoclonales, inmunohistoquímica (*página 87*), histopatología (*página 58*) y citología (*página 73*), entre otros. En Medicina Veterinaria los métodos diagnósticos de rutina son la citología y la histopatología.

El aspecto de las neoplasias varía considerablemente de acuerdo a su estirpe histológica. Sin embargo, se pueden considerar algunos criterios que ayudan en la mayoría de las veces a identificar si la neoplasia es benigna o maligna.

CRITERIOS MACROSCÓPICOS DE MALIGNIDAD

Los tumores **benignos** suelen ser:

- localizados
- no invasivos
- bien delimitados
- la mayoría de las veces encapsulados por tejido conectivo
- de crecimiento lento y generalmente por expansión.

En contraste, los tumores **malignos**:

- son invasivos y su crecimiento es infiltrante, por lo que tienden a destruir abundante tejido a su alrededor;
- crecen rápidamente;
- dan metástasis y
- algunos llegan a presentar **cápsula**, aunque ésta puede estar invadida por células neoplásicas.

Cabe señalar que los sarcomas crecen en forma expansiva, presionando al tejido normal adyacente, causando las llamadas **zonas de compresión**. Alrededor de éstas se observa tejido edematoso, no vascularizado, llamado **zona reactiva**, la cual es más evidente en tumores de alto grado de malignidad y de crecimiento rápido. Las zonas de compresión y reactiva forman una **pseudocápsula**. Esta estructura fácilmente se confunde con una cápsula bien delimitada. El cirujano veterinario debe tener presente esto, ya que en ocasiones es posible retirar parte de la neoplasia, dejando la pseudocápsula que es potencialmente maligna, por lo que el paciente puede desarrollar nuevamente el tumor e incluso presentar metástasis.

CRITERIOS MICROSCÓPICOS DE MALIGNIDAD

⁷⁰En los tumores malignos se presenta **pleomorfismo**; es decir, una marcada variación de tamaño y forma celular, por lo que hay una variación en la relación núcleo - citoplasma. Por otro lado, el núcleo puede presentar escotaduras, uno o varios nucléolos muy aparentes (signo de reactividad) y mitosis atípicas.

⁷⁰ El examen de laminillas de neoplasias se describe en la página 70 del capítulo de “*Revisión y descripción de cortes histológicos*”.

CLASIFICACIÓN DE NEOPLASIAS

Uno de los criterios más importantes es clasificar las neoplasias de acuerdo a su estirpe o morfología en:

- epiteliales
- mesenquimales y
- tumores de células redondas.

Hay que tener presente que no siempre es posible agrupar las neoplasias de esta forma, ya que las características de algunos tumores no lo permiten; en estos casos es posible describir sus características de benignidad o malignidad, lo cual es una información útil para el médico clínico.

Neoplasias epiteliales

En los tumores epiteliales benignos no hay cambios displásicos, las células guardan estrecho parecido al tejido de origen. Hay ligeras variaciones de tamaño, el nucléolo ligeramente prominente con ligera pérdida de la relación núcleo - citoplasma. Las neoplasias epiteliales benignas, especialmente los adenomas, deben diferenciarse de las hiperplasias.

Las neoplasias epiteliales tienden a descamar sus células en cordones o racimos y en menor cantidad, células sueltas. Los arreglos tubulares, acinares y papilares pueden identificarse como un adenoma o adenocarcinoma. Las células epiteliales neoplásicas pueden ser grandes con un moderado o abundante citoplasma y núcleo generalmente redondo.

Neoplasias mesenquimatosas

Los tumores mesenquimatosos frecuentemente están compuestos de células alargadas o fusiformes. Su forma de descamar es principalmente en células aisladas y en ocasiones formando grupos. El núcleo es pequeño o mediano, ligeramente basófilo, redondo u oval.

Neoplasias de células redondas

Los tumores de células redondas incluyen el mastocitoma, el tumor venéreo transmisible (TVT), el histiocitoma, los linfomas y el melanoma de células redondas. Tienen la tendencia

a descamar células aisladas. En el caso del mastocitoma, el distinguir sus gránulos citoplásmicos con HE, o ponerlos en evidencia con una tinción de azul de toluidina (*página 82*) o Giemsa (*página 76*), prácticamente hace el diagnóstico.

Melanomas

Debe recordarse que existen melanomas amelanóticos que no son fáciles de diagnosticar, ni aún con técnicas de histoquímica como Fontana-Masson.

INFLAMACIÓN Y NEOPLASIAS

Tanto las neoplasias benignas como las malignas pueden cursar con un proceso inflamatorio, siendo más frecuente en las malignas. En las benignas, esta inflamación puede producir cambios morfológicos, por lo que hay que tener precaución en la observación, sugerir una terapia desinflamatoria y repetir la toma de muestra.

DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

La citología ofrece la posibilidad de emplear diferentes técnicas de obtención de células, en este caso neoplásicas, como son: la punción con aguja delgada (PAD), raspados, improntas y lavados como se describe en el capítulo de citología (*véase la página 73*).

Es importante señalar que debido a las características físicas de algunos tumores de piel y tejidos blandos, la PAD no siempre suele ofrecer el material suficiente para emitir un diagnóstico preciso, por lo que en ocasiones es necesario recurrir a la biopsia.

La técnica citológica de elección para tumores internos y de tejidos blandos es la PAD. Sin embargo, algunos tumores se presentan ulcerados, por lo que es posible obtener el material por medio de un raspado en el área ulcerada; o bien, una vez que se obtiene la pieza quirúrgica es factible realizar una impronta y obtener el diagnóstico rápidamente.

DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO⁷¹

Para el estudio histopatológico es necesario una vez obtenida la muestra, describir su aspecto macroscópico: dimensiones, color, consistencia, borde quirúrgico, número de piezas e incluso su peso. La pieza o piezas se sumergen en tinta china (para poder identificar los **bordes quirúrgicos** al examen histopatológico: *véase la página 70*) y se fijan en formalina amortiguada al 10% en una proporción 1:20 para posteriormente ser procesados por el método de inclusión en parafina y ser teñidas con la tinción de hematoxilina-eosina.

En ocasiones no basta la observación con la tinción de hematoxilina-eosina, siendo posible utilizar la histoquímica (*véase la página 76*) para poner de manifiesto algunos productos o componentes de las células neoplásicas. Asimismo, en el cuadro 12 (*página 1*) se mencionan algunas técnicas de inmunoperoxidasa (*véase la página 87*) que se pueden usar, sobre todo en aquellas neoplasias malignas indiferenciadas donde no se puede determinar su estirpe histológica con técnicas de rutina.

Aunque el uso de la inmunohistoquímica por razones económicas aún no está muy difundida en nuestro medio, ofrece múltiples ventajas en el diagnóstico y la investigación en medicina veterinaria.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Battifora, H.: Inmunohistoquímica Aplicada. *Curso Pre - Congreso. Asociación Mexicana de Patólogos. XXXV Reunión Anual en Provincia de la Asociación Mexicana de Patólogos. 30 de Abril al 5 de Mayo, 1992.*
- Candanosa, A. E., De Buen, N., Trigo, T. F.: Correlación Citohistológica de las Lesiones Cutáneas en el perro. *Vet. Méx., 18: 3-11, 1987*
- Cowell, R. L. and Tyler, R. D.: *Diagnostic Cytology of the Dog and Cat.* American Veterinary Publications, U.S.A., 1989.

⁷¹ El examen de laminillas de neoplasias se describe en la página 70 del capítulo de "Revisión y descripción de cortes histológicos".

- De Buen, N., Candanosa, A. E., Castillo, A.C.:
Diagnóstico Citológico en Veterinaria, Análisis
de 3563 casos. *Vet. Méx.*, 19: 211-215, 1988.
- Ezinger, F. M., Weiss, S. W.: *Tumores de Tejidos
Blandos*. Editorial Médica Panamericana. Ar-
gentina, 1985.
- Moulton, J. E.: *Tumors in Domestic Animals*. Uni-
versity of California Press. 3rd de. U.S.A.,
1989.
- Muller, G. H., Kirk, R. W.: *Dermatología en Pe-
queños Animales*. 4a. ed., InterMédica. Ar-
gentina, 1991.
- Madji, M., Morales, A. R.: *Inmunoperoxidase
Techniques: A Practical Approach to Tumor
Diagnosis*. American Society of Clinical Pa-
thologists Press. U.S.A., 1986.
- Thomson, R. G.: *Special Veterinary Pathology*. B.
C. Decker, U. S. A, 1988.
- Withrow, S. J., MacEwen, E.G.: *Clinical Veteri-
nary Oncology*. J. B. Lippincott, U.S.A., 1989.

CUADRO 12. NEOPLASIAS CUTÁNEAS EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS.					
<i>Nombre</i>	<i>Especie, edad, raza, sexo</i>	<i>Localización</i>	<i>Aspecto macroscópico</i>	<i>Histopatología</i>	<i>OBSERVACIONES PARTICULARES</i>
Carcinoma epidermoide	Todas las especies principalmente gatos; bovinos Hereford y caballos de colores claros. Animales adultos	En áreas no pigmentadas o claras de escaso pelo o dedos	Es variable: nodular, proliferativos, costroso, ulcerado o en forma de cuerno	Cordones e islas de epitelio estratificado escamoso, perlas de queratina, disqueratosis, muchas mitosis atípicas y ruptura de la membrana basal	Perlas de queratina y puentes intercelulares
Fibroma, Fibrosarcoma	Adultos viejos; todos los animales domésticos	Dermis o subcutis	Circunscrito (fibroma); firme a suave; flexible, blanco - grisáceo	Bandas de fibroblastos y colágena que se entrelazan en diferentes direcciones; células fusiformes que producen colágena	Gatos jóvenes: Leucemia Viral Felina involucrada, tumores múltiples
Fibropapiloma	Sólo en bovinos, en toros jóvenes y vacas	Pene del toro, vulva y vagina de vacas	Masa irregular unida al pene, menor que el papiloma	Proliferación del epitelio con extensiva proliferación de colágena en fascículos y círculos	Asociado al virus del papiloma bovino
Hemangioma, Hemangiosarcoma	Adultos viejos: congénito en potros; más en perros; menos en gatos, caballos, bovinos, borregos y cerdos	Hemangioma: dermis o subcutis; Hemangiosarcoma: más común en órganos internos	Rojo, café a negro; circunscrito (hemangioma); suave; al corte fluye sangre	Interconexiones de vasos sanguíneos	Trombosis frecuente en hemangioma
Histiocitoma cutáneo canino	Perros; más de la mitad se presenta antes de los 2 años de edad; predisposición en razas puras.	Cabeza, principalmente punta de la oreja; parte distal de miembros y pies	Simple o múltiple, en forma de domo; firme; circunscrito; comúnmente ulcerado	Capas de células redondas grandes separadas por fibras de colágena, mitosis frecuentes, pueden tener focos de necrosis, e inflamación	Rápido crecimiento y regresión espontánea
Leiomioma, Leiomiomasarcoma	Muy raro	Piel asociada con vasos sanguíneos cutáneos o músculo pilo-erector	Único, firme, circunscrito	Fibras de músculo liso entrelazadas que tienden a intersectarse en ángulo recto; núcleo en forma de "puro"	
Linfoma cutáneo	Perros; menos en gatos y caballos; edad variable	Generalmente en masas en la piel; con presentación epidérmica y dérmica en perros (raramente en gatos)	Variable: nódulos generalizados o multifocales, placas, úlceras, dermatitis eritematosa a exfoliativa con o sin lesiones sistémicas	Dérmicas: capas de linfocitos en dermis Epidérmicas: capas de linfocitos en epidermis	Las formas dérmica y epidérmica se presentan en perros. En otras especies se presenta la forma dérmica
Lipoma y liposarcoma	En perros adultos y seniles, menos común en caballos y vacas.	Subcutáneos y retroperitoneales.	Delimitados, blandos, blancos, ligeramente translúcidos, flotan en formalina	Adipocitos maduros en lipoma, en sarcoma células redondas a fusiformes con citoplasma vacuolado.	Grasa en cortes por congelación.

Mastocitoma	De los más frecuentes en perro, generalmente en boxers, menos en otras especies; en adultos, ocasionalmente recién nacidos	Perro: en piel, especialmente en miembros	Nódulo único o múltiple o pobremente circunscrito, edematoso, tempranamente ulcerado; blanco - grisáceo con puntillero rojizo	Capas de células redondas con citoplasma granular, no encapsulado, puede presentar eosinófilos; vasculitis	Eosinófilos; gránulos metacromáticos en células cebadas; otras lesiones: vasculitis, necrosis de la colágena, ulceración gastrointestinal; tiempo de coagulación prolongado
Melanoma	Perros, caballos, cerdos, con menos frecuencia en caprinos, raro ovinos.	Superficies despigmentadas, párpados, paladar, perianal, debajo del maslo en equinos.	En perros solitarios, en caballos múltiples; máculas a nódulos, café oscuro o negro.	Hay nevos benignos, compuestos, de unión o dérmicos. Los malignos son anaplásicos. Células epitelioides a fusiformes con nucléolos prominentes, con o sin pigmento.	Melanina en el citoplasma excepto en los amelanóticos.
Papiloma	Común en caballos y bovinos, poco frecuentemente en perro, cabra y borrego, raro en gatos. Frecuente en animales jóvenes.	Cualquier área de la piel; caballos cara y cuello	Masa única o múltiple, sesil o pedunculado	Proyecciones papiliformes del epitelio hiperqueratosis, acantosis y abundante colágena.	Puede tener regresión.
Pilomatricoma	En perros Kerry blue terrier (tumores múltiples) Poodles adultos	Piel y subcutáneo del tronco	Usualmente simple, discreto, firme, masa dérmica, puede estar mineralizado; puede ulcerar o ser quístico	Lóbulos de células pequeñas en cordones, frecuentemente con formación de quistes con "células fantasmas"	Puede tener área de mineralización
Quiste de inclusión epitelial	Perro	Cualquier área de la piel	Pared epitelial quística delgada con queratina	Pared de epitelio escamoso y su luz contiene queratina laminada	Puede romperse y producir reacción inflamatoria a cuerpo extraño
Sarcoide Equino	Tumor más frecuente de piel de caballos: caballo, burro, mula	Piel de miembros, tronco y cabeza	Pedunculado o sesil, único o múltiple; generalmente ulcerado, puede ser verrucoso o fibroblástico	Parecido al fibroma hiperplasia pseudo-epiteliomatosa marcada	Auto - transplantable, algunos regresibles
Tricoepitelioma	Principalmente perros y gatos; mayores de 5 años	Piel y subcutáneo especialmente de espalda	Firme, discreto, blanco grisáceo, puede ulcerar	Variable, algunos tienen más células basales, y otros más células escamosas, básicamente folículos pilosos sin pelo	Puede tener áreas de mineralización
Tumor de células basales	Adultos y viejos; principalmente perros y gatos y raro en otros animales domésticos	Cabra, cabeza, cuello, dermis y subcutáneo	Solitario o múltiple, discreto, sólido o quístico; firme; blanco grisáceo; puede ulcerar	Células basales pequeñas de escaso citoplasma, mitosis frecuentes; sólido, adenoide baso-escamoso, medusoide	Ausencia de puentes celulares; puede contener pigmento melánico
Tumor de glándula mamaria	Perras y gatas.	Glándulas mamarias.	Solitarios o múltiples, comúnmente ulcerados e infectados.	Componente neoplásico epitelial (adenocarcinomas y epidermoides), y/o componente neoplásico sarcomatoso (mioepitelio, metaplasia cartilaginosa y ósea).	Puede ser benigno o maligno.

Perros viejos, principalmente en machos.	Piel perianal, base de la cola, prepucio y vulva.	Uno o varios nódulos circunscritos, anaranjados, grasosos.	Adenomas: semejante a hiperplasia nodular. Adenocarcinomas: células poliédricas (semejantes a hepatocitos), crecimiento desordenado e invasión linfática.	En machos, la castración o tratamiento con estrógenos causa involución.
Perros adultos.	Piel de cualquier parte del cuerpo.	Adenoma: gris, grasoso, lobulado.	Adenoma: Similar a hiperplasia glandular. Epitelioma: semejante a células basales. El carcinoma es raro.	Las glándulas de Meibomio son idénticas.
Perros y gatos viejos; apócrino es poco común, y merócrino es raro	Cualquier localización donde haya glándulas	Adenoma: crecimiento lento, pequeño, quístico, bien circunscrito; Carcinoma: firme, fibroso e infiltrante	Hileras largas de una o dos capas de células epiteliales, que forman espacios quísticos amorfos, pueden presentar mezcla de células mioepiteliales, cartilago o hueso	Se puede presentar en su forma mixta
Perros en edad sexualmente activa	Pene; prepucio, vagina, vulva; con menor frecuencia extra - genital.	Solitario o múltiple; frecuentemente papilar; firme, puede ulcerar	Capas de células tumorales grandes y redondas con células inflamatorias y fibras reticulares; mitosis comunes	Tumor trasplantable, células tumorales con 58 o 59 cromosomas; transmitido por coito

Proceso para microscopía electrónica

*Sofía González Gallardo
Germán Valero Elizondo
Eliseo Hernández Baumgarten*

Introducción

Formación de la imagen en el microscopio electrónico

La formación de la imagen del microscopio electrónico de barrido

La formación de la imagen del microscopio electrónico de transmisión

Características de la muestra

Autólisis

Preparación de la muestra

Tinción negativa

Solución fijadora de Karnowsky

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

La investigación biológica se ha visto incrementada extraordinariamente con el empleo del microscopio electrónico, ampliando los horizontes que hacen posible establecer una unión entre la morfología y la bioquímica; por medio de éste se han podido relacionar las propiedades macroscópicas con la ultraestructura celular, lo cual ha hecho confluír a muchas ramas de la biología.

Las nuevas estructuras y los componentes moleculares que han sido descubiertos con la ayuda del microscopio electrónico, han abierto nuevos campos del conocimiento de la célula y sus organelos, que han revolucionado

a la citología, a tal grado que sus estudios caen dentro del campo de la biología molecular.

Existen básicamente dos tipos de microscopio electrónico: microscopio electrónico de transmisión (MET), y el microscopio electrónico de barrido (MEB), sus equivalentes en microscopía óptica son el microscopio de campo claro y el microscopio de disección respectivamente.

FORMACIÓN DE LA IMAGEN EN EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

Los microscopios electrónicos de transmisión y barrido tienen como fuente común de electrones lo que se denomina el cañón electrónico. Este dispositivo, como su nombre lo sugiere, es el encargado de suministrar el haz de electrones con que va a bombardear el espécimen. Los electrones requieren de un alto vacío para reducir las probabilidades de interacción con una molécula de gas, y son modificados en su trayectoria sólo por los campos electrostáticos como los que contienen los átomos, y que atraen o rechazan a los electrones según su carga. Los campos magnéticos también afectan la trayectoria de los electrones, de tal manera que el campo magnético circular que crean las bobinas de las lentes magnéticas de estos aparatos tienen el efecto de una lente convergente. Variando la corriente a través de las bobinas, se cambia la "convexidad" de las lentes y su aumento.

La formación de la imagen del microscopio electrónico de barrido

El haz de electrones es enviado sobre el objeto (la muestra), chocando contra la superficie de la misma, dando origen a un complicado fenómeno de interacción. Como resultado de esta interacción, se emiten diferentes tipos de radiaciones; entre ellos se encuentran los electrones secundarios que serán recogidos por medio de un detector, el cual se encarga de transformarlos en señales eléctricas que, a su vez serán presentadas en una pantalla de rayos

catódicos, obteniéndose una imagen con profundidad de campo y una agradable perspectiva tridimensional.

La resolución obtenida por el microscopio electrónico de barrido es considerablemente inferior a la obtenida con el de transmisión.

La formación de la imagen del microscopio electrónico de transmisión

En la formación de imagen en el MET, el haz de electrones es enviado hacia la muestra, los electrones primarios pasan a través de ésta, por lo que es necesario usar cortes o preparaciones muy delgadas. En la muestra, la masa de los colorantes empleados (sales de metales pesados), crea campos electrostáticos de mayor intensidad según su concentración, y esto a su vez causa la desviación de los electrones, creando en la pantalla de sulfuro de zinc un punto oscuro en las zonas más densas, y en las zonas de menor densidad un punto gris y las zonas claras, un punto brillante y de esta manera la imagen esta dada por una serie de puntos que van de claros a oscuros pasando por la gama de grises. La imagen así obtenida es plana y sin profundidad de campo. Los electrones también tienen la capacidad de reducir los granos de plata de la película fotográfica, por lo que se necesita intercalar una película apropiada en el paso de los electrones, después de que el haz ha sido modificado por la muestra y amplificado por tres lentes magnéticas. Con frecuencia las fotografías son el único registro de la muestra estudiada, ya que la muestra se destruye por el bombardeo de los electrones la mayoría de las veces.

El microscopio electrónico de transmisión tiene un aumento potencial de 100,000 diámetros; sin embargo, las preparaciones de material biológico no permiten una resolución mayor de 20 angstroms.

CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

La formación de la imagen en MET depende de diversos factores como son: el poder de resolución y contraste así como las características ópticas de cada microscopio; sin embargo, el principal problema del microscopista para conseguir la resolución adecuada es la obtención y preparación de la muestra. Las muestras para ser vistas por microscopía electrónica deben tener ciertas características:

- en caso de ser material biológico, debe ser conservada la estructura celular lo más intacta posible
- no debe contener agua en su estructura, por lo que se debe deshidratar
- en el caso de MET la muestra para obtener buena resolución no debe de tener un grosor mayor de 60-150 nm
- debe de teñirse la muestra para aumentar la densidad electrónica de partes selectas, a fin de permitir una observación de detalles más finos.

Sólo deben trabajarse aquellos casos que requieran examen de ME para su evaluación o diagnóstico. Si las lesiones macroscópica, microscópicas y otros exámenes practicados son suficientes para emitir el diagnóstico deseado, no deben desperdiciarse el tiempo y los recursos en hacer estas preparaciones que suelen resultar muy costosas y tardadas. Así mismo, si se puede obtener la misma información con la simple laminilla teñida con HE, debe preferirse a la microscopía electrónica.

Para que las muestras que han de observarse al MEB no adquieran campos electrostáticos como consecuencia de la interacción con los electrones, es necesario cubrir la superficie de la muestra con un material electroconductor, como puede ser oro, plata o paladio.

Autólisis

Las características de la autólisis fueron descritas en la página 59 del capítulo sobre histología.

Para microscopía electrónica la autólisis que ocurre en los primeros minutos de la muerte ya es notoria, por lo que las mejores muestras son las obtenidas con fijación por perfusión de los tejidos cuando el animal todavía no muere.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La mejor muestra para microscopía electrónica es la que se obtiene por perfusión, por canulación cardíaca, sustituyendo los líquidos corporales por fijador y de ésta manera fijar *in situ* los tejidos, evitando así los procesos autolíticos. Pero en caso de que la perfusión no sea posible, se recomienda tomar la muestra lo más rápido posible *postmortem*.

Una vez tomada la muestra, esta es cortada con dos navajas *Guillette*, colocándolas en forma encontrada para evitar rasgar el tejido, la muestra debe estar sumergida en fijador de glutaraldehído (véase "fijador de Karnowsky" en la página 48); para el caso de microscopía electrónica de transmisión, el tamaño de la muestra es de 3 mm cúbicos y para rastreo puede ser hasta de 5 mm cúbicos; una vez transcurrido el tiempo de fijación, se elimina el fijador de glutaraldehído, con tres lavados con amortiguador de fosfatos; de ésta manera puede ser enviada al laboratorio para su posterior procesamiento y observación por microscopía electrónica ó en su defecto guardada a 4 grados centígrados, (lo más recomendable es enviarla al laboratorio inmediatamente para ser procesada y estudiada).

El proceso rutinario para la observación de cortes por MET comprende:

- **Obtención de la muestra** de 2-3 milímetros cúbicos, y por inmersión se fijan los tejidos, con fijador de glutaraldehído, de una a dos horas. Se elimina el exceso de glutaralde-

hído con tres lavados de amortiguador de fosfatos (véase la página 45).

- **Posfijación con tetraóxido de osmio**, durante una a dos horas (todas las operaciones con tetraóxido de osmio deben ser realizadas en campana de extracción, pues los vapores de tetraóxido de osmio son muy tóxicos y particularmente a las mucosas de los ojos). Se elimina el exceso de tetraóxido de osmio con tres lavados de amortiguador de fosfatos.
- **Deshidratación**, se puede realizar con etanol ó con acetona en concentraciones ascendentes.

Hasta aquí el proceso para MET y MEB es el mismo.

- En el caso de MET se realiza la **infiltración** y **encapsulación** de los tejidos en un plástico de dureza controlable y de alta pureza. Se sigue la metodología establecida por el fabricante, para obtener el bloque, pues si se usa por ejemplo *araldita* el líquido de infiltración es el tolueno y si se usa *epon* el líquido de infiltración es el óxido de propileno.
- Los bloques obtenidos son **desbastados** manualmente con navajas desechables de un solo filo ó con el *piramitón*, hasta obtener la forma de pirámide, quedando la cara de corte libre de resina, y se procede a cortar en el ultramicrotomo.

Para realizar **cortes finos y semifinos** se puede usar cuchilla de vidrio o de diamante; la elección es por preferencias personales o limitaciones presupuestales (una cuchilla de diamante cuesta 6000 dólares), las cuchillas de vidrio son desechables, y las cuchillas de diamante pueden mandarse afilar con el fabricante; las cuchillas de vidrio pueden comprarse hechas o hacerlas en el laboratorio, si se cuenta con el cortador de cuchillas, para lo cual se compran las barras de vidrio flotado de 6 mm de grosor y 25 mm de ancho. A las cuchillas se le forma una poceta con cinta adherible en el lado del filo de la cuchilla.

En el ultramicrotomo se calibra con la cara de corte del bloque en relación a la cuchilla, obteniéndose la cara de espejo al hacer incidir el haz de luz con el baño de agua destilada de la poceta. Primero se obtiene el corte de fase, el cual refleja un color azul (grosor de 240-190 nm), al flotar sobre la poceta. Los cortes semifinos se colocan sobre un portaobjetos y se adhiere al portaobjeto por calor y se tiñen con una solución acuosa de azul de toluidina al 1%, en una platina caliente hasta la formación de un anillo alrededor y se enjuagan a chorro de agua de la llave y se observan en el microscopio óptico.

Con los cortes semifinos se aprecia excelentemente el detalle celular y se pueden evaluar cuales son los bloques y secciones que valen la pena ser estudiados para obtener cortes finos. Posteriormente se localiza la zona de mayor interés, perfeccionando la pirámide para la obtención del corte fino, el cual reflejará un color dorado ó plateado (grosor de 60-100 nm) en la imagen de espejo de la cuchilla. Para el estudio de secciones finas, el contraste se mejora mediante el tratamiento con iones pesados (sales de plomo, acetato de uranilo, nitrato de lantano); éste método permite mayor resolución, además de proporciona mayor protección del corte fino para el haz de electrones.

Los cortes finos teñidos con citrato de plomo y acetato de uranilo (doble tinción electroconductiva), pueden ser estudiados y analizados en el microscopio electrónico de transmisión, y constituyen a la microscopía electrónica lo que a la microscopía óptica es la Hematoxilina - Eosina.

En el caso de MEB los tejidos después del alcohol de 100%, se ponen en crioprotector (acetato de amilo), y las muestras son **secadas a punto crítico** con bióxido de carbono, posteriormente son colocadas sobre el porta muestras, con tintura de plata electroconductiva, y en el ionizador con un electrodo de oro ó paladio, se les aplica una **capa electroconductora** ionizante de estos metales, a la

muestra. La muestra queda lista para ser observada en el microscopio electrónico de barrido.

TINCIÓN NEGATIVA

La técnica de tinción negativa constituye la principal metodología para un diagnóstico rápido de virus, debido a que los virus son identificados principalmente por su morfología. Las muestras clínicas recibidas para su identificación se encuentran en exudados, secreciones ó excreciones, en las cuales los virus están suspendidos.

Aunque la tinción negativa provee el más simple y rápido método para la detección de virus en muestras clínicas, únicamente una pequeña porción de la muestra es examinada sobre la rejilla y se necesitan entre 1,000,000 a 10,000,000 de partículas por mililitro en la muestra original para tener una buena oportunidad de detectar partículas virales intactas y con buena estructura.

Las rejillas de 300 mallas, cubiertas con membrana de *fomvar* ó *parlodión*, ofrecen un soporte estable para las muestras teñidas negativamente. La máxima estabilidad de los soportes plásticos es aumentada por una capa de carbón evaporado, la cual provee un sustrato fino, para las micrografías de alta resolución.

El elemento activo de tinción del ácido fosfotúngstico es el tungsteno (P.M. = 183.92), con la especial característica de que éste compuesto se asocia en cada molécula de 24 átomos de carbono del mismo. Por el gran peso molecular de éste ácido, las tinciones electrónicas denotan una gran resistencia al bombardeo del haz de electrones en el microscopio electrónico.

Preparación de la muestra

Las muestras bacterianas son lavadas con amortiguador de fosfatos ó solución salina fisiológica (*página 45*), para eliminar cualquier residuo proteico, presente; mientras que las

suspensiones virales se requieren lo más concentradas posible.

Método: Puede realizarse por dos métodos diferentes:

Método A: Se mezclan cantidades iguales de solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 2% con pH 7.2, y la suspensión de partículas se impregna en la rejilla que previamente se preparó con una membrana plástica (de colodión, fomvar, ó parlodión y/o carbón).

Método B: La rejilla de cobre, previamente preparada con membrana plástica, se deja flotar sobre una gota de muestra durante 5 a 30 minutos; se elimina el exceso y se pasa a una gota de ácido fosfotúngstico al 2% durante 5 a 10 minutos; se elimina el exceso de líquido, secándose y se ve al microscopio electrónico de transmisión.

Existen un sinnúmero de técnicas especializadas que no se mencionarán aquí, pero que se pueden encontrar en los manuales de Microscopía Electrónica.

SOLUCIÓN FIJADORA DE KARNOWSKY

La solución fijadora de Karnowsky está formada por:

- 2% formaldehído
- 3% glutaraldehído

disueltos en solución amortiguada de fosfatos 0.1 M. (*La preparación de la solución fijadora de Karnowsky se describe en la página 48*)

Solución de acetato de uranilo al 2%

Se disuelven 5g de acetato de uranilo deshidratado en 25 ml de metanol en agitación constante; se almacena a 4 °C en frasco ámbar protegido de la luz, el uranilo es un poco radiactivo, por lo que se debe tener cuidado con su manejo.

Solución de citrato de plomo

Se prepara con 30 ml de agua destilada hervida, 1.33g de nitrato de plomo y 1.76g de

citrato de sodio deshidratado, se agita por un minuto y se deja reposar 30 minutos con agitaciones ocasionales. Se añaden 80 ml de solución de hidróxido de sodio 1 N y 50 ml de agua destilada hervida. Se almacena en envases de plástico; esta solución es muy alcalina por lo que llega a disolver el vidrio, además se debe evitar que la solución esté en contacto con el aire, porque se puede formar un precipitado de carbonato de plomo.

LECTURAS RECOMENDADAS

Las siguientes referencias pueden servirle al lector interesado en ampliar la información sobre preparación de muestras para microscopía electrónica:

- Doane W. Frances y Andeson Nan: *Electron microscopy in diagnostic virology*. Cambridge University Press. USA, 1987.
- Goldstein I. J. y Yakowitz H.: *Practical Scanning electron microscopy*. Plenum Publishing Corporation. USA, 1977.
- Mercer E. H. y Birbeck: *Manual de microscopía electrónica para biólogos*. H. Blume Ediciones. Madrid, España, 1979.
- Sommerville, J. & Scheer, S: *Electron microscopy in molecular biology*. A practical approach. IRL Press. Oxford, England, 1987.
- Watt, M.: *The principles and practice of electron microscopy*. Cambridge University Press. England, 1985.

Toma y envío de muestras para diagnóstico de enfermedades bacterianas y micóticas

Francisco Aguilar Romero

Beatriz Arellano Reynoso

Efrén Díaz Aparicio

Víctor R. Tenorio Gutiérrez

María de Lourdes Ontiveros Corpus

Introducción

Muestras para examen bacteriológico y micológico

Obtención de muestras

Identificación de las muestras

Diferentes tipos de muestras

Sangre

Exudados

Orina

Leche

Heces

Tejidos y órganos

Bacterias que requieren un tratamiento especial

Bacterias anaerobias

Actinobacillus pleuropneumoniae

Brucella

Campylobacter

Haemophilus somnus

Mycobacterium tuberculosis y *M. paratuberculosis*

Mycoplasma

Salmonella

Muestras de enfermedades micóticas

Comentario final

Observaciones

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

Un problema frecuente en la microbiología clínica veterinaria es el estudio de muestras inadecuadas, que a menudo carecen de una historia clínica completa. Una muestra obtenida en forma adecuada es el paso más importante en el diagnóstico de una infección, debido a que el resultado de un análisis microbiológico depende en gran parte de la selección, el tiempo y el método de obtención de las muestras. Las bacterias y hongos crecen, proliferan y mueren; son susceptibles a muchas sustancias químicas, y pueden encontrarse en sitios anatómicos diferentes y en líquidos y tejidos corporales distintos durante la evolución de las enfermedades infecciosas. Por lo tanto, la muestra debe obtenerse del sitio donde sea más probable que se encuentre el microorganismo, y se manejará en tal forma que favorezca la supervivencia y proliferación del mismo.

El aislamiento de bacterias y hongos es más significativo si el agente es recuperado de un sitio donde normalmente no se encuentra. Por el contrario, existen regiones anatómicas que tienen una microflora normal, que hay que tomar en cuenta en el momento de la interpretación de los resultados.

MUESTRAS PARA EXAMEN BACTERIOLÓGICO Y MICOLÓGICO

Existen algunas reglas generales que se aplican a todas las muestras:

- La cantidad de material debe ser adecuada.
- La muestra debe ser representativa del proceso infeccioso.
- Evitar que se contamine la muestra, utilizando sólo material estéril y tomando las precauciones de asepsia necesarias.

- Enviar la muestra lo más pronto posible al laboratorio y en condiciones de conservación adecuadas (congelación, refrigeración, medio de transporte, según sea el caso)
- Obtener las muestras de animales que no hayan sido sometidos a tratamiento.
- Si se ha estado dando tratamiento antimicrobiano, será necesario suspenderlo antes de obtener las muestras, para repetir la toma de muestra varios días después.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

La selección y obtención de la muestra es el paso más importante dentro del diagnóstico veterinario de las enfermedades infecciosas, ya que el valor de los resultados depende de forma directa de la selección, preparación, manejo y forma de envío de las muestras. Como primera opción es importante obtener las muestras de animales vivos que sean representativos de la enfermedad en estudio, para obtener sangre y exudados antes del sacrificio. Además se podrá efectuar una necropsia (*véase el capítulo “Inspección de cadáveres” en la página 11*), para observar lesiones y obtener las muestras para varias pruebas diagnósticas. La segunda opción es la de obtener muestras de un animal recientemente muerto (no más de 3 horas). El tipo de muestras que se obtengan y se vayan a examinar se determinarán por el cuadro clínico; si los signos son sugestivos de la alteración de un sistema orgánico, las muestras se obtienen de esa fuente.

IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Al remitir al laboratorio las muestras, éstas deberán estar perfectamente identificadas, con los datos del remitente o responsable de la explotación. La etiqueta deberá contener además los datos del animal, tipo de muestra, fecha y hora de la toma. Las muestras deberán de ir acompañadas de una historia clínica completa y la descripción de los hallazgos a la

necropsia (*véase la página 15*) si se cuenta con ellos.

DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS

A continuación se describen los métodos para la obtención y manejo de los diferentes tipos de muestras:

Sangre

La toma de sangre se recomienda cuando se sospecha de bacteremia. La muestra de sangre (7 ml) deberá obtenerse durante el estado febril, o lo más pronto posible dentro de la fase aguda de la enfermedad de la siguiente forma:

- Cortar el pelo en el punto de punción venosa y lavar el área con jabón.
- Secar perfectamente con una toalla desechable.
- Desinfectar con torunda de algodón impregnada en solución de alcohol al 70%.
- Emplear agujas y tubos estériles del sistema *vacutainer* con una solución de citrato sódico al 2% o con un miligramo de heparina; ciertos anticoagulantes como el *EDTA* no deberán usarse por tener efecto bactericida.
- De ser posible, la sangre se puede sembrar inmediatamente en caldo tioglicolato en una proporción de 1:10 v/v o en placas de agar-sangre; de no ser así, la sangre se enviará en refrigeración al laboratorio.

Exudados

Si los animales presentan exudado nasal, ocular, cervicovaginal, prepucial, de heridas y saliva, lo más recomendable es utilizar hisopos estériles con palillo flexible; aunque hay muchas bacterias que son susceptibles a la desecación durante el transporte al laboratorio. Esto se remedia al incluir el hisopo en un medio de transporte como el de Stuart. La muestra se recogerá con el hisopo de algodón seco y si es posible se sembrará directamente en placas de agar sangre y agar McConkey; de no ser así, se introducirá en el medio de transporte y se enviará en refrigeración al laboratorio más cercano.

En el caso de **exudados cérvico - vaginales**, la toma de la muestra (1 ml) se realizará con la ayuda de un espéculo estéril, por donde se introducirá un hisopo de longitud apropiada hasta el cérvix o el cuello del útero. En el caso de bovinos y equinos, se podrá usar una pipeta de inseminación estéril en lugar del hisopo, con la cual se aspirará, ayudados por una jeringa conectada al extremo de la pipeta con un tubo de látex. La muestra deberá ser enviada en refrigeración.

Exudados de oído

En casos de otitis se obtendrá exudado por medio de hisopo o jeringa, limpiando el canal externo con un antiséptico y tomar la muestra (1 ml) en el oído medio.

Orina

Las muestras de orina (6 ml) se pueden obtener por punción de la vejiga, cateterización o al momento que el animal orine, según se prefiera. Lo ideal es inocular, inmediatamente después de la toma de la muestra, de 0.1 a 0.5 ml de orina en 8 a 10 ml de caldo tioglicolato; incubar 24 horas, para posteriormente sembrar en agar sangre y agar McConkey e incubar aerobia y anaerobiamente. Se requerirá refrigeración para su transporte al laboratorio, que deberá ser dentro de las dos horas siguientes a su colección.

Leche

(véase el capítulo sobre mastitis en la página 118)

Heces

Las muestras de materia fecal se pueden obtener directamente del recto de algunos animales grandes, introduciendo la mano protegida con guante desechable de plástico, el cual puede servir como envase si se invierte y amarra al nivel de la muñeca. En el caso de animales pequeños se debe limpiar la piel alrededor del ano; humedecer un hisopo en caldo tioglicolato e introducirlo en el recto.

Las muestras para aislamiento de *Salmonella* se describen más adelante (página 115).

Tejidos y órganos

Durante la colección y manejo de este tipo de muestras, se deberán tomar todas las medidas de asepsia posibles con la finalidad de no contaminarlas. Los tejidos y órganos seleccionados deberán colocarse individualmente en bolsas de plástico. La mitad se enviará para estudios bacteriológicos y la otra parte se incluirá en formalina al 10% para estudios histopatológicos. La muestra deberá enviarse congelada o refrigerada lo más pronto posible. Si el animal tiene más de 3 horas de muerto, puede haber invasión de bacterias del tracto digestivo, sobre todo en épocas y lugares calurosos, por lo que se recomienda obtener una costilla o un hueso largo con la finalidad de realizar cultivos de médula ósea.

BACTERIAS QUE REQUIEREN UN TRATAMIENTO ESPECIAL

Bacterias anaerobias

Estas bacterias pueden causar infecciones en cualquier lugar del organismo, sobre todo en tejidos donde se presente una disminuida cantidad de oxígeno y un bajo potencial de óxido-reducción. Muchas de estas infecciones son causadas por bacterias provenientes de fuentes endógenas, tales como la flora normal de los tractos gastrointestinal, genitourinario, cavidad oral y piel; aunque también ocurren infecciones exógenas.

Los procesos infecciosos de donde principalmente se aíslan bacterias anaerobias son:

- abscesos
- bacteremia
- sinusitis crónica
- pleuritis (especialmente crónica)
- peritonitis
- endometritis *postpartum*
- piometra
- mastitis

- gangrena gaseosa
- osteomielitis
- y gabarro (pododermatitis).

Es importante recalcar que las muestras para aislamiento de anaerobios deben ser tomadas de sitios libres de contaminación con bacterias de la flora normal. Las muestras clínicas de donde es posible obtener cultivos de bacterias anaerobias son:

- pus aspirada
- tejidos obtenidos por biopsia, cirugía o necropsia
- líquidos corporales (cerebroespinal, pleural, pericárdico, sinovial)
- aspirado transtraqueal
- lavado broncoalveolar
- y “gránulos de azufre”, similares a los de actinomicosis.

Al recoger muestras de piel y mucosas, se deben tomar estrictas precauciones a fin de descontaminar adecuadamente la superficie. Se recomienda una limpieza con jabón neutro, seguido de una desinfección con alcohol etílico o isopropílico al 70% y tintura de yodo, eliminando luego el yodo con alcohol.

Siempre que sea posible la recolección de muestras para anaerobios debe hacerse con aguja y jeringa; existen tubos *vacutainer* especiales para anaerobios. Se debe evitar el uso de hisopos, porque desecan y también porque exponen a los anaerobios al oxígeno atmosférico. Sin embargo, existen en el mercado medios comerciales para envíos de hisopos bajo condiciones anaerobias; estos contienen el hisopo en un medio anaerobio y un segundo tubo que contiene un medio semisólido de transporte.

Una vez recogidas las muestras, se debe tener especial atención en protegerlas de exposición al oxígeno y de enviarlas rápidamente al laboratorio; se mantienen a temperatura ambiente, ya que las bajas temperaturas favorecen la absorción de oxígeno.

Las muestras de tejido deberán ser pequeñas (menores de 1 cm³) y deben ser

procesadas inmediatamente o colocadas en medios comerciales para transporte de anaerobios.

En el caso de sospechar de miositis asociada a *Clostridium*, las muestras de músculo (de preferencia descontaminadas) pueden ser colocadas en un tubo con medio estéril de carne cocida⁷² y enviadas sin refrigerar al laboratorio en no más de 48 horas.

En caso de animales que han muerto, se deben de tomar las muestras para cultivo de anaerobios inmediatamente, antes de que las bacterias anaerobias de la flora normal invadan el cadáver y puedan confundir el diagnóstico.

Actinobacillus pleuropneumoniae

Actinobacillus pleuropneumoniae (antiguamente *Haemophilus paraahaemolyticus*) es el agente causal de la pleuroneumonía contagiosa porcina, que ocasiona las mayores pérdidas económicas por enfermedad respiratoria en los cerdos.

Las muestras de donde es posible realizar el aislamiento son:

- lesiones pulmonares
- exudado nasal o bronquial
- y líquido pleural

Las muestras para cultivo deben enviarse refrigeradas o congeladas al laboratorio. Es recomendable enviar bloques grandes de tejido para asegurar el aislamiento.

No se recomienda el empleo de medios de transporte como el de Stuart.

El aislamiento se realiza en agar sangre de ovino, con atmósfera con 5 a 7 % de CO₂ (microaerobiosis) y con la ayuda de un cultivo cruzado en línea de *Staphylococcus epidermidis* como cepa nodriza, para proporcionar el dinucleótido de nicotinamina adenina (*NAD* o factor V), que es indispensable para el crecimiento del *Actinobacillus*.

En caso de infecciones mixtas (comúnmente con *Pasteurella multocida*), es recomen-

⁷² 0.5 g del medio en 9 ml de agua destilada.

dable utilizar la técnica de dilución en caldo *PPLO*⁷³.

Una parte muy importante del diagnóstico bacteriológico es la serotipificación, ya que se conocen (en 1997) 12 diferentes serotipos, que no proporcionan inmunidad cruzada.

Brucella

Las muestras ideales para el aislamiento de bacterias del género *Brucella* son los tejidos, órganos y secreciones que se mencionan más adelante, leche y sangre. También se pueden tomar muestras de alimento y derivados lácteos. Si bien el aislamiento de la *Brucella* es la prueba definitiva de la enfermedad, en muchas ocasiones es posible diagnosticar la enfermedad con la determinación de anticuerpos contra *Brucella* (véase el capítulo “Diagnóstico de brucelosis” en la página 125).

Órganos y tejidos

- **Sangre:** Tomar en un tubo con vacío, estéril, con heparina como anticoagulante, y enviar en refrigeración.
- **Nódulos linfáticos:** supramamarios, ilíacos internos, lumbares, pre-escapulares, mesentéricos y parotídeos. Se colectan completos, quitando lo más posible la grasa, sin incidirlos.
- **Órganos:** bazo, glándula mamaria, útero, ovarios, testículos y glándulas sexuales accesorias. Se toman 2 cm³ de cada uno, flameando antes con un cerillo el área a tomar o aplicando una espátula caliente al rojo vivo.
- **Fetos** (véase el capítulo sobre abortos en la página 22): pulmón, bazo, cotiledones placentarios y contenido estomacal (en una jeringa estéril). El feto debe ser enviado dentro de las tres horas de haber ocurrido el aborto.

Todo lo anterior se envía en frascos estériles o en bolsas de plástico nuevas (estériles), en

congelación o refrigeración, bien identificados individualmente.

Líquidos y secreciones corporales

Estos incluyen leche, semen, secreción vaginal, orina, líquido sinovial de articulaciones inflamadas y, en el caso de caballos, el exudado de alguna fístula en la cruz o de tejidos profundos.

- **Leche:** Se lavan los pezones y se desinfectan con alcohol al 70%. Se desechan los primeros dos chorros de leche y se toman individualmente 10 ml de cada cuarto en tubos de vidrio con tapón de rosca estériles.
- **Semen y orina:** Desinfectar el área genital y tomar en frascos o tubos estériles.
- **Hisopo vaginal:** Desinfectar el área genital, abrir suavemente la vulva con los dedos enguantados e introducir un hisopo estéril, girar un poco y retirarlo. Introducir en un tubo con medio de transporte; romper y desechar la parte donde fue tomado el hisopo con los dedos; si es posible flamear con un cerillo la boca del tubo. Cerrar muy bien el tubo. Los medios de transporte que se recomiendan son caldo triptosa, caldo tripticasa soya y caldo peptonado. Enviar en refrigeración.
- En el caso de exudados y líquido sinovial se envían en jeringas estériles en refrigeración.

Muestras de alimento y derivados lácteos

Se toman en frascos o bolsas estériles. Se envían en refrigeración.

Campylobacter

La bacteria causal se aísla principalmente a partir de heces, vesícula biliar y de moco cervicovaginal. El *Campylobacter* es una bacteria muy delicada en cuanto a su crecimiento, ya que se desarrolla muy lentamente. Como a menudo se requiere intentar el aislamiento a partir de material muy contaminado, por esta razón se recomienda que se siembre primeramente en un medio especial: Medio selectivo de transporte, que inhibe el crecimiento de otras bacterias. Esto es impor-

⁷³ DIFCO Laboratories.

tante, ya que las bacterias contaminantes que crecen en 24 horas impiden observar al *Campylobacter*.

El medio selectivo de transporte consta de caldo de carne, 5-fluorouacilo, verde brillante, ciclohexamida y sulfato de polimixina.

La toma de moco cérvico - vaginal puede hacerse en borregas con un hisopo estéril, o mediante la utilización de pipeta de inseminación en vacas. Las muestras deben inocularse en medio líquido de tioglicolato y ser enviadas en refrigeración al laboratorio.

Haemophilus somnus

Haemophilus somnus es una bacteria microaerofílica⁷⁴ de gran importancia en ganado bovino; afecta tractos respiratorio y genitourinario, además de sistema nervioso central (causa la meningoencefalitis tromboembólica bovina), por lo que las muestras de donde se puede aislar son: tejidos, exudados y lavados prepuciales. Las muestras de tejido podrán ser enviadas al laboratorio en congelación; no así los exudados y lavados, que deberán ser inoculados dentro de las primeras 3 horas después de la toma. Se recomienda utilizar como medio agar chocolate suplementado con extracto de levadura y suero; pero sobre todo se debe especificar en el laboratorio donde se trabajará la muestra que se sospecha de éste microorganismo, para que se cultive en las condiciones de microaerobiosis que son necesarias para su desarrollo.

Mycobacterium tuberculosis y M. paratuberculosis

Las micobacterias son bacilos ácido - alcohol resistentes, de las cuales algunas se consideran saprófitas y otras patógenas como *Mycobacterium bovis*, *M. paratuberculosis*⁷⁵ y *M. avium*. Estas tres especies son de gran importancia en medicina veterinaria, mientras que *M. tubercu-*

losis y *M. leprae* constituyen un gran problema en la salud humana. Los gatos y armadillos pueden tener lepra, pero usualmente no la transmiten al humano.

Este género bacteriano es de difícil aislamiento, por lo que la toma de muestras y el envío al laboratorio de bacteriología debe hacerse con especial cuidado.

Las características que debe tener una muestra sospechosa de micobacteriosis, son las siguientes:

- Ser representativa de la lesión a investigar.
- Enviar una cantidad suficiente.
- Colocarla en envase o medio de transporte adecuado.
- Estar bien identificada.
- Ser conservada y transportada adecuadamente.

Para la identificación de las micobacteriosis se realiza el diagnóstico bacteriológico e histopatológico (véase la página 79), y las muestras de elección para esto son tejidos y órganos colectadas en la necropsia o inspección sanitaria *postmortem* en el rastro.

En animales **reactores positivos a la tuberculina** y en los que se encuentre una lesión sugestiva de tuberculosis en cualquier parte, se deben examinar los siguientes nódulos linfáticos y órganos:

Nódulos linfáticos

- En la región de la cabeza: submaxilares, sublinguales, parotídeos y retrofaríngeos.
- Tórax: mediastínicos y bronquiales.
- Región abdominal: hepáticos y mesentéricos.
- Nódulos linfáticos superficiales: poplíteos, pre-escapulares, inguinales y mamarios.

Órganos

- pulmón, bazo e hígado.

Si se sospecha de **paratuberculosis** se deben tomar nódulos linfáticos mesentéricos, y una porción de la válvula ileocecal del intestino.

⁷⁴ Requiere una atmósfera especialmente enriquecida con CO₂.

⁷⁵ *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

Muestras de leche

Se limpian los pezones con alcohol etílico al 70%, posteriormente se ordeñan los cuartos y se toman en tubos estériles sin conservador, 10 ml de los **últimos chorros de leche** por cada uno de los cuartos. Se envían en refrigeración o congelación.

Orina

Se toma en tubos estériles, sin contaminar la muestra con heces.

Heces

Se desechan las heces del recto usando un guante de palpación, se lava el exterior con agua y jabón, se sacan de dos a tres gramos de heces con un guante nuevo y se colocan en un frasco estéril.

Manejo de las muestras para diagnóstico de micobacteriosis

Al tomar la muestra, se debe hacer lo más asépticamente posible; si se requiere enjuagar, puede utilizarse solución salina fisiológica (véase la página 45) estéril o agua destilada estéril. Posteriormente se divide el tejido en dos porciones iguales: una para el laboratorio de bacteriología y la otra para el laboratorio de histopatología (véase la página 79). Es importante que la lesión provenga de un solo tejido; por ejemplo: no es conveniente que se tome un granuloma de pulmón para bacteriología y un granuloma de hígado para histopatología, ya que las etiologías pueden ser diferentes y los resultados de ambos laboratorios podrían no coincidir.

Manejo de las muestras para aislamiento de micobacterias

Las muestras de tejido deben ser colocadas en una solución saturada de tetraborato de sodio (bórax), estéril (6% p/v), en una proporción de solución : tejido de 1 : 1. La solución de tetraborato es antiséptica e impide el desarrollo de otros microorganismos diferentes a *Mycobacterium*, por lo que los tejidos pueden ser conservados hasta por cuatro o más semanas en esta solución refrigerada, aunque se

recomienda que no demoren más de una semana. Para preparar esta solución es necesario calentar el agua para que se disuelvan los cristales; y una vez fría, los cristales pueden precipitar; lo que no afecta a la muestra.

En una lesión granulomatosa es muy importante que se incluya la cápsula del granuloma, más que el exudado caseoso; ya que las micobacterias viables se suelen encontrar en los macrófagos y células gigantes que están en la periferia del granuloma.

Si no se dispone de frascos o solución de tetraborato, una alternativa es enviar los órganos en bolsas de plástico nuevas (estériles) en congelación.

Mycoplasma

Estos microorganismos afectan principalmente los tractos respiratorio y urogenital, intestino, articulaciones, conjuntiva y glándula mamaria (véase la página 121 del capítulo de mastitis), por lo que cuando se sospeche de infecciones causadas por este tipo de bacterias, las muestras que deberán ser obtenidas son tejidos, exudados, orina, líquido sinovial y leche, según sea el caso. Para obtener resultados óptimos, estas muestras deberán ser inoculadas inmediatamente después de la colección en un medio como el caldo *PPLO*⁷⁶ adicionado con algunos inhibidores bacterianos y fungales como penicilina, acetato de talio, polimixina B, etc., para su transporte al laboratorio. Si la muestra no es procesada dentro de las 24 horas después de la toma, se almacenará a - 20 °C .

Salmonella

Cuando se sospeche de *Salmonella* spp, conviene tomar varias muestras a intervalos durante el día, porque el resultado negativo de una sola muestra no es concluyente. Se deberán enviar en refrigeración.

En cadáveres de mamíferos y reptiles sospechosos de *Salmonella* conviene tomar muestras de vesícula biliar, hígado, asa intestinal, sangre y médula ósea.

⁷⁶ *DIFCO Laboratories.*

En el caso específico de la salmonelosis aviar, se recomienda ⁷⁷ para el aislamiento de *S. pullorum* y *S. gallinarum*:

- A partir de aves rectoras positivas, tristes o enfermas, se deberá sembrar hígado, bazo, vesícula biliar, ovarios, testículos, tonsilas cecales y páncreas.
- De aves muertas se trabajará hígado, bazo, vesícula biliar, ovarios y médula ósea.
- En aves de combate, de ornato, canoras y silvestres se intentará el aislamiento a partir de hisopos cloacales y/o hisopos con heces frescas.
- En pollito se sembrará a partir de hígado, bazo, vesícula biliar y saco vitelino.
- Finalmente en embrión de 18 días se trabajarán hígado y saco vitelino.
- Se recomienda utilizar medios de enriquecimiento como caldo tetrionato, caldo selenito, agar McConkey y agar verde brillante como medios de cultivo.
- Se podrán enviar al laboratorio aves vivas o también órganos completos en refrigeración en un plazo máximo de 48 horas posteriores a su toma.
- Los hisopos se podrán enviar en agua peptonada o cualquier otro medio de transporte como el de Stuart y deberán conservarse en refrigeración.

MUESTRAS DE ENFERMEDADES MICÓTICAS

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

Cuando se sospeche de una micosis sistémica, se pueden enviar trozos de tejido

afectado en bolsas de plástico en refrigeración. También se puede mandar esputo, orina, leche o material purulento del área afectada en frascos estériles.

COMENTARIO FINAL

En México existen condiciones que han permitido la persistencia de la tuberculosis y la brucelosis bovina en algunos hatos. Aunque no siempre es factible el aislamiento o la observación al microscopio de *Mycobacterium bovis* y *Brucella abortus*, puede haber suficientes bacterias para lograr la infección de un prosector imprudente que maneje las muestras sin las precauciones necesarias. Existen demasiados Médicos Veterinarios portadores crónicos de *Brucella* que demuestran la ley de Murphy aplicada a las zoonosis.

OBSERVACIONES

Algunas de las enfermedades mencionadas en este capítulo están en etapa de control o erradicación en los diferentes países de Latinoamérica, por lo que la producción e importación de antígenos está regulada por las autoridades de Sanidad Animal correspondientes. De igual forma, debe consultarse la legislación local para la comunicación de los casos sospechosos de enfermedades de notificación obligatoria.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Altón, G. G, Jones, L. M, Angus, R. D, & Berger, J. M.: *Techniques for the brucellosis laboratory*. FAO / OMS -WHO- Institute National de la Recherche Agronomique, Paris, 1988.
- Carter, G. R.: Selection and submission of clinical specimens, in: *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. Edited by G. R. Carter and J. Cole. Fifth edition. Academic Press. USA. 1990.
- Cottal, E. G.: *Manual de métodos estandarizados en Microbiología Veterinaria*. La Prensa Médica Mexicana S.A., 1ª ed. en español. México. 17-27. 1986
- Donahue, J. M. Non-spore-forming anaerobic bacteria, in: Carter, G.R.: *Diagnosis procedures in Veterinary Bacteriology and Micology*. Fifth edition, Academic Press Inc. 177-185. 1990.

⁷⁷ Norma Oficial Mexicana que regula la Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar.

- Fenwick, B. Pleuropneumonía porcina en el laboratorio, en: *Compendio sobre Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. editado por la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. 17-22, 1990
- Jones, L. M, Dubray, G. y Marly, J.: Comparision of methods of diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Ann. Rech. Vet* 11:-22, 1975.
- Koneman E. W., Allen S. D., Dowell V. R. y Sommers H. M. *Diagnóstico Microbiológico*. Panamericana, México. 342-379. 1985.
- Lennette, E. H. *Manual of Clinical Microbiology*. 3rd edition, American Society for Microbiology, U. S. A. 52-82, 394-417, 1980.
- Microbiología Médica* de Jawetz, Melnick y Adelberg, Manual Moderno, México. 636-637. 1992.
- Osbalditon, G. W.: *Técnicas de laboratorio en Bacteriología Veterinaria*. Acribia, Zaragoza, España. 28-30.
- Willis, A.T. *Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice*. 3rd edition, Butterworths, London, 1977.

Diagnóstico de mastitis

Laura Hernández Andrade

Introducción

Prueba de California

Prueba modificada de Wisconsin

Prueba de Whiteside

Diagnóstico automatizado

Diagnóstico bacteriológico

Obtención aséptica de las muestras

Identificación, transporte y almacenamiento

Procesamiento y siembra en el laboratorio

Identificación de los microorganismos aislados

Prueba de susceptibilidad a los antibióticos

Interpretación de resultados negativos en muestras de leche

Análisis bacteriológico de muestras de leche de tanque

Mastitis ovina

Mastitis caprina

Observaciones

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

La mastitis subclínica suele ser el principal problema sanitario en las vacas lecheras y esto es reflejado en grandes pérdidas económicas. Existen varios procedimientos para el diagnóstico de la mastitis subclínica; entre ellos están los fisicoquímicos como: determinaciones de cloruros, pH, albúmina sérica, conductividad eléctrica y prueba de la catalasa. Entre los más usados a nivel de campo están la prueba de

California y la prueba de Wisconsin modificada (*véase más adelante*).

El estudio de la concentración de células somáticas en leche (*usando microscopía de contraste de fases, página 55, u otra técnica*) es una prueba de diagnóstico muy utilizada en el laboratorio. Se fundamenta en el hecho de que la concentración de células en la leche se eleva marcadamente al comienzo de la enfermedad, particularmente en la fase inflamatoria, debido al paso de leucocitos de la sangre a la glándula mamaria y llega a alcanzar varios millones por mililitro de leche. Los valores de conteo celular somático presentan gran variación, que hace necesaria una gran cautela para juzgar como enferma o como sana una vaca. El conteo celular individual está influido por el manejo y el estado fisiológico, así como por el tipo de microorganismos que produce la infección, pudiendo incluso observarse variaciones en los niveles normales de células somáticas entre vacas no infectadas.

El laboratorio es esencial en el plan de control de mastitis, pero no es una panacea, ya que el veterinario clínico es quien debe interpretar los resultados que el laboratorio le proporciona, para la adecuada toma de decisiones.

PRUEBA DE CALIFORNIA

El reactivo ⁷⁸ para esta prueba contiene un detergente que desintegra a las células de la leche, lo que produce un conglomerado de células, que da una apariencia viscosa. Mientras mayor es el número de células, más viscoso será el líquido, y se dará una calificación mayor. Esta prueba es cualitativa y se hace durante el ordeño; la leche no debe contener preservativos. Esta prueba consiste en:

- Colocar de 5 a 10 ml del reactivo de California en cada uno de los cuatro reci-

⁷⁸ Lauril sulfato de sodio 2.4 g + sulfonato de trietanolamina 2.7 g + púrpura de bromocresol 0.01 g + agua cbp 100 ml.

pientes (uno por cada cuarto) de la pala especial.

- Obtener de 5 a 10 ml de leche y mezclarla con el reactivo, por medio de movimientos circulares del brazo durante 10 a 20 segundos
- Leer la reacción: negativo, traza, 1 +, 2 + y 3 +.
- Esta última calificación indica más de dos millones de células somáticas por ml.

PRUEBA MODIFICADA DE WISCONSIN

Esta es una prueba cuantitativa, sensible y económica que puede utilizarse en un programa de control de mastitis. Esta prueba consiste en:

- Colocar 3 ml de leche en los tubos especiales para esta prueba.
- Se adicionan 3 ml de reactivo (se usa el reactivo de California diluido con agua en proporción 1:1).
- Se tapan los tubos y posteriormente se mueve la gradilla durante 10 segundos, casi hasta posición horizontal.
- Se dejan reposar los tubos durante 15 segundos.
- Se invierte la gradilla en posición vertical y se deja que salga la mezcla durante 15 segundos.
- Se regresa la gradilla a la posición normal y se hace la lectura de los mililitros sobrante.
- Se interpreta de acuerdo al siguiente cuadro:

Mililitros	Células (miles) / ml
0 - 1.0	0 - 100
1.1 - 1.5	101 - 500
1.6 - 2.0	501 - 1000
2.1 - 2.5	1001 - 1700
2.6 - 3.0	1701 - 2500
> 3.0	> 2500

PRUEBA DE WHITESIDE

Esta es una prueba cualitativa, sencilla y económica. Se basa en la adición de un álcali

fuerte, que causa la coagulación de las proteínas del citoplasma de las células somáticas, formando grumos. El tamaño de los grumos es proporcional a la concentración de células somáticas. Se utiliza una placa de acrílico negra con cuadros de 3 cm por 3 cm. El procedimiento consiste en:

- Colocar 5 gotas de leche fría en el centro del cuadro
- Agregar 2 gotas de solución de hidróxido de sodio al 4%.
- Mezclar vigorosamente, utilizando un palillo, por 20 segundos.
- Se interpreta de acuerdo al siguiente cuadro:

Reacción	Células (miles) / ml
negativo	0 - 300
traza	300 - 600
1 +	600 - 1000
2 +	1000 - 2000
3 +	> 2000

DIAGNÓSTICO AUTOMATIZADO

Existen aparatos para estimar el número de células somáticas en leche mediante el recuento automatizado de partículas por tamaño (*Coulter-Counter*) o por tinción fluorescente de los núcleos celulares (*Fossomatic*).

El aumento de la permeabilidad de las vénulas que ocurre en la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria permite la salida de iones cloruro (y moléculas grandes como albúmina sérica) a la leche. Esto puede evaluarse:

- Cuantificando iones cloruro en leche con un potenciómetro y electrodo especial; un procedimiento rápido, económico y confiable.
- Midiendo la conductividad eléctrica de la leche, que depende de la concentración total de iones; al parecer algunos aparatos tienen baja repetibilidad.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Se pueden considerar cinco etapas sucesivas en el análisis bacteriológico de las muestras de leche:

- Obtención aséptica de las muestras.
- Identificación, transporte y almacenamiento adecuados.
- Procesamiento y siembra en el laboratorio.
- Identificación de los microorganismos aislados.
- Prueba de susceptibilidad a antibióticos.

Obtención aséptica de las muestras

La obtención de resultados confiables en el examen bacteriológico de leche (como en otros muchos casos) depende en gran medida de la toma correcta de la muestra.

Para obtener una muestra de leche para análisis bacteriológico se deben seguir procedimientos muy estrictos de asepsia, con el objeto de evitar la contaminación con microorganismos que se encuentran comúnmente en el pelo o piel de la vaca o en el ambiente donde se tome la muestra.

Se pueden utilizar viales desechables estériles o tubos de ensayo con tapón de rosca de 15 ml de capacidad. El tiempo de colecta debe ser breve y ajustado con base en las condiciones de manejo del hato. La colecta de muestras se puede realizar antes o entre la ordeña, pero tomar las muestras antes de la ordeña permite obtener un mayor número de patógenos.

Para la toma de muestra los tubos se identifican con el número de la vaca y el cuarto muestreado. La persona que tome las muestras debe lavarse y desinfectarse las manos entre vaca y vaca.

Los pezones se lavan con solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 0.2% y se secan perfectamente con toallas desechables. Después se desechan los primeros chorros de la leche, con el propósito de eliminar residuos contaminantes. Se desinfectan los meatos de los pezones, frotando vigorosamente el meato con torundas

humedecidas en alcohol al 70% (etílico, metílico o isopropílico). Cuando se desea muestrear los cuatro pezones, se desinfectan primero los pezones que se encuentran más distantes, para evitar la contaminación. Si la vaca patea o mueve la cola, será necesario desinfectar los meatos de los pezones nuevamente. El tubo no debe tocar el pezón, que será ordeñado con la mínima presión posible. Cuatro o cinco ml de muestra son suficientes.

Identificación, transporte y almacenamiento

Primero se debe realizar un registro de los datos del animal, solicitando el historial clínico de mastitis en el establo. No se debe olvidar anotar el aspecto de la leche (normal, desuerada, color, olor y presencia de grumos). Cada tubo debe indicar el número del animal y el cuarto muestreado. Cada cuarto de la ubre es una unidad independiente, por lo que no se deben mezclar muestras de diferentes cuartos, sino remitirlas al laboratorio siempre por separado.

Las muestras se tienen que mantener todo el tiempo previo a su cultivo a 4 ó 5 °C, por lo que se deben transportar en refrigeración. Las muestras pueden ser sembradas inmediatamente o refrigeradas, procurando realizar el sembrado dentro de las primeras 24 horas de tomadas las mismas.

Procesamiento y siembra en el laboratorio

Se siembra de 0.01 ml a 0.1 ml de la muestra de leche en placas de agar sangre. El volumen mínimo de inóculo será de 0.01 ml; puesto que en ocasiones, la población bacteriana es inferior a 200 bacterias / ml, lo que da lugar a cero o una colonia. Se recomienda de 0.05 ml a 0.25 ml, dependiendo de como se hayan recogido y conservado las muestras. Según el volumen de inóculos será la superficie de siembra:

- 0.01-0.025 ml de inóculo: ¼ de la placa Petri de 10 cm
- 0.05 ml: media placa
- 0.1 ml: una placa

Las placas se incuban de 24 a 48 horas a una temperatura de 35 °C. A las colonias desarrolladas se les realiza la tinción de Gram (*página 77*) y así iniciar la identificación. En caso que se sospeche de bacterias poco comunes, se utilizarán medios de cultivo más específicos, ya que para un óptimo aislamiento de los microorganismos, es esencial inocular la muestra en el medio de cultivo apropiado.

Los medios más usuales para aislamiento de microorganismos específicos son:

- Bacterias Gram negativas: agar McConkey
- Hongos: Saboureaud dextrosa.
- *Mycoplasma*: medio de Friis.
- *Staphylococcus*: Agar 110, agar Sal manitol y Baird Parker.
- *Streptococcus*: medio de Edward, TKT.

Identificación de los microorganismos aislados

Después de 24 a 48 horas de incubación se realiza la interpretación de la siguiente manera:

- Observando las características y cantidad de cada tipo de colonias aisladas en agar.
- Se determina la pureza (al menos a cinco colonias idénticas), la reacción de Gram y la morfología de las bacterias de cada tipo de colonias.
- Se observan los cambios en el medio que rodea las colonias, ya que reflejan la actividad metabólica de las bacterias aisladas.
- En las placas de agar sangre se debe realizar el examen a trasluz, para detectar reacciones hemolíticas en el agar, que pueden ser las siguientes:
 - ◊ Hemólisis incompleta o alfa: es un aclaramiento parcial de la sangre alrededor de las colonias con coloración verde del medio.

- ◊ Hemólisis completa o beta: es un aclaramiento completo de la sangre alrededor de las colonias, debido a la lisis de los glóbulos rojos.
- ◊ Ausencia de hemólisis: en la que no hay cambio en el medio que rodea a la colonia.

La caracterización final en género y especie de un aislamiento bacteriano desconocido, se logra mediante la detección de ciertos sistemas enzimáticos exclusivos de cada especie, que sirven como marcadores de identificación.

Entre las especies microbianas más relevantes en mastitis bovina existe una gran variedad:

- Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosum*, *S. warneri*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Actinomyces pyogenes* y *Bacillus cereus*.
- Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pasteurella* y *Pseudomona*.
- Levaduras como *Cryptococcus* y *Candida*.
- Diferentes especies de *Mycoplasma*: *M. bovis genitalium*, *M. bovis*, *M. canadense*, *Ureaplasma*.

Un tipo de microorganismos menos común es *Prototheca*, que es un **alga** incolora que causa mastitis aguda en vacas y puede ser confundida con una levadura. Crece lentamente en agar sangre y en agar Sabouraud Dextrosa de 25 a 37 °C, produciendo estructuras similares a quistes. Estas estructuras pueden tener hasta ocho células hijas, que posteriormente son liberadas. Las especies descritas como causantes de mastitis son: *Prototheca zopfii* y *Prototheca wickerhamii*.

La clasificación taxonómica de varios microorganismos ha cambiado desde 1974, con la introducción de técnicas de hibridación de ADN. Por ejemplo, el género *Staphylococcus* que aparecía con tres especies originalmente, actualmente cuenta con 23. El género *Streptococcus* ha dado origen a tres

géneros: *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. La familia *Enterobacteriaceae*, que de 12 géneros con 42 especies, ha pasado a 22 géneros y 120 especies.

Es muy importante recordar que *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella abortus* también pueden causar mastitis, que en estos casos son particularmente importantes por el riesgo de zoonosis. El aislamiento de estas dos bacterias requiere de medios y técnicas especiales (véanse las páginas 114 y 112 del capítulo de “Toma de muestras para diagnóstico de enfermedades bacterianas”)

Prueba de susceptibilidad a los antibióticos

La prueba de susceptibilidad a los antibióticos es muy útil para orientar en el tratamiento, debiendo ser valorada por el veterinario, considerando la farmacocinética a nivel de glándula mamaria.

El uso indiscriminado de los antibióticos ha generado cepas de microorganismos multirresistentes, por lo que la aportación periódica de los laboratorios de diagnóstico de los patrones de susceptibilidad y resistencia de los microorganismos aislados puede servir de orientación al clínico o responsable del control de la mastitis.

Se debe tener en cuenta que los conceptos de sensibilidad o resistencia han sido obtenidos a partir de los valores de concentración mínima inhibitoria en medicina humana, por lo que sólo en parte son extrapolables al tratamiento de mastitis, debido al ambiente de la glándula mamaria.

El medio recomendado para hacer la prueba es el agar Mueller Hinton. En algunos estudios se ha modificado este medio con leche, para tener un resultado más cercano al que se tendría en la glándula mamaria. La eficacia *in vitro* de un antimicrobiano se valora mediante el porcentaje de curaciones clínicas y bacteriológicas. Es importante recordar que en muchas ocasiones existe una pobre concordancia

entre la actividad de los antibióticos *in vivo* e *in vitro*.

Interpretación de resultados negativos en muestras de leche

Las descripciones de la literatura señalan que entre el 25 y el 40% del total de muestras tomadas de casos clínicos de mastitis bovina son negativas en cultivos bacteriológicos de rutina. Las razones pueden ser las siguientes:

- Microorganismos como los *Mycoplasmas*, *Staphylococcus aureus* y coliformes, pueden variar grandemente en cantidad y eliminación al exterior a partir de los cuartos infectados, y pueden estar por debajo del límite mínimo de detección, que es de 100 unidades formadoras de colonia por ml, sembrando en la placa de agar 0.01 ml de esta leche.
- El microorganismos puede no estar presente en el momento de la colecta y los signos clínicos deberse a subproductos bacterianos como las endotoxinas.
- Las células somáticas pudieron haber fagocitado a los microorganismos.
- Los antibióticos pudieron haber eliminado o reducido el número de microorganismos viables a niveles no detectables.
- El almacenamiento de la muestra pudo haber reducido el número de microorganismos viables a niveles no detectables.
- Los microorganismos requieren de condiciones de cultivo diferente a las utilizadas para su aislamiento (por ejemplo: temperatura reducida, incubación prolongada, medio de cultivo especial, condiciones de microaerobiosis o anaerobiosis, etc.).
- Mastitis de origen traumático.

Análisis bacteriológico de muestras de leche de tanque

Es importante realizar el análisis bacteriológico del tanque por lo menos una vez al mes. Este tipo de análisis puede:

- Establecer la calidad de la leche que está produciendo el rancho.

- Identificar si hay o no algún problema de salud en la glándula mamaria de las vacas del hato.

Este análisis es un indicador indirecto del manejo del establo, especialmente cuando se tiene un buen control de las mastitis subclínicas, ya que puede detectar:

- ◆ Preparación incorrecta de la ubre: La tierra y el estiércol adherido a las vacas son la fuente principal de bacterias en la leche.
- ◆ Limpieza deficiente del equipo de ordeña: Las impurezas orgánicas y minerales se pueden acumular en la superficie del equipo y proporcionar los medios para que las bacterias crezcan y se multipliquen.
- ◆ Mal enfriamiento, ya que la leche tibia es un excelente medio para el crecimiento de bacterias.

Las infecciones en casos de mastitis pueden causar altos recuentos bacterianos en la leche del tanque.

MASTITIS OVINA

En ganado ovino, especialmente en razas lecheras, la mastitis origina graves pérdidas económicas, atribuidas a los costos de reposición, pérdida de producción láctea y el descenso en la tasa de crecimiento del cordero.

Entre las características de las mastitis ovinas se encuentra la escasa incidencia de mastitis estreptocócica y la importancia de la mastitis representada por el virus *Maedi-Visna* (neumonía progresiva ovina), su diagnóstico se basa en métodos directos basados en el aislamiento del virus, la visualización del virus por microscopía electrónica, la detección de antígenos en células infectadas, o serología por inmunodifusión en gel y por inmunoensayo enzimático (*ELISA*). Los *Staphylococcus*, *S. aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativos ocasionan la mayoría de las mastitis bacterianas. Con una frecuencia menor se encuentran *Pasteurella* (*P. haemolytica*, hasta seis serotipos diferentes y *P. multocida*), *Actinomyces pyogenes*,

Mycoplasma agalactiae. Entre las bacterias Gram negativas menos frecuentes se encuentran *Actinobacillus seminis*, *Histophilus ovis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

El aspecto alterado de la leche es suficiente para clasificar la mayoría de los casos clínicos de mastitis ovina, pero en algunos casos es necesaria la realización de pruebas indirectas de diagnóstico, como las pruebas de California o Whiteside, y si se prefiere una mayor precisión se puede realizar el conteo celular.

En el ganado ovino se han descrito valores umbrales de células somáticas en leche muy diferentes: desde 200,000 células/ml hasta cifras superiores a 1×10^6 células/ml, correspondiendo en ocasiones los valores más elevados a las razas cárnicas; pero se ha definido el umbral en 200,000 células/ml. Un conteo que sobrepase un millón de células se asocia con una alta probabilidad de infección. Se han observado muestras de leche de oveja con recuentos celulares de varios millones, que presentan un aspecto macroscópico totalmente normal, sin apreciar ningún flóculo al comienzo del ordeño, circunstancia muy diferente a lo observado en ganado bovino. En estos casos surge la necesidad de la combinación de datos (bacteriología, Whiteside o recuento celular).

MASTITIS CAPRINA

La importancia de la cabra para aprovechar recursos naturales en zonas desfavorecidas, junto a su aptitud láctea, ponen de manifiesto la importancia de la mastitis caprina. El recuento celular somático es un elemento fundamental, pero para realizarlo es necesario determinar previamente un umbral fisiológico que permita clasificar correctamente los medios sanos de los infectados. En el ganado caprino todavía no está bien definido este umbral; esto es debido a que la secreción láctea en la cabra es de tipo apócrino; es decir, las células epiteliales durante el proceso de secreción pierden parte de su citoplasma aportando

partículas citoplásmicas a la leche. Estas partículas están presentes tanto en la secreción de glándulas mamarias sanas como en las infectadas. Por ello, sólo deben emplearse métodos específicos de cuantificar el ADN para estimar el recuento celular somático en leche de cabra. Además, existen otros factores que influyen, como el incremento fisiológico a lo largo de la lactación y la edad. Se han referido concentraciones celulares (excluidas las partículas citoplásmicas anucleadas) similares en la primera y segunda lactación (844,000 células/ml), aumentando a las lactaciones siguientes (1.135,000 células/ml) y en animales de sexta lactación en adelante (1.440,000 células/ml).

Entre los agentes etiológicos de las mastitis bacterianas en cabras, los *Staphylococcus* son los más prevalentes, siendo los *Staphylococcus* coagulasa negativos los más frecuentes: *S. caprae*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*. Las corinebacterias suponen el segundo grupo más prevalente; otros grupos menos frecuentes son bacilos Gram negativos, enterobacterias y estreptococos.

OBSERVACIONES

Algunas de las enfermedades mencionadas en este capítulo están en etapa de control o erradicación en los diferentes países de Latinoamérica, por lo que la producción e importación de antígenos está regulada por las autoridades de Sanidad Animal correspondientes. De igual forma, debe consultarse la legislación local para la comunicación de los casos sospechosos de enfermedades de notificación obligatoria.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Abascal G.C.: Variación del contenido celular en la leche de oveja. *Ovis tratado de patología y producción ovina.. 22: 49-62* Luzan 5 S.A. Madrid 1992
- Carter, G. R.: *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. 5 th Ed. Charles C. Thomas. Springfield, 1984.
- Corrales, J.C., Sánchez, A., Sierra, D., Marco, J.C & Contreras A: Relationship between somatic cell counts and intramammary pathogens in goats. *International symposium "Somatic cells and milk of small ruminants"*. Bella Italy. 17-21 1994
- Cottral, G. E.: *Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology*. Cornell University Press. Ithaca, 430-436, 1978.
- Dulin, A.M., Paape, M.J., Schultze, W. D. and Weinland, B.T.: Effect of parity, stage of lactation, and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goat milk. *J. Dairy Sci.*, 66: 2426-2433, 1983.
- Laboratory and field Handbook on bovine mastitis*. National Mastitis Council. 1989.
- Marco, J.C., Romeo L., Romeo M.: Etiología. *Ovis Tratado de patología y Producción ovina.. 21: 25-43*. Luzan 5 S.A. Madrid, 1992.
- Microbiological procedures for diagnosis of bovine udder infection* 3rd. Ed. *National Mastitis Council, Inc.* Washington. D. C. 1990.
- Pérez, M.: *Manual sobre Ganado Lechero*. Diana, México, 1984

Diagnóstico de brucelosis

Francisco Velázquez Quezada
Jesús Vázquez Navarrete
Arturo Mancera Martínez
Efrén Díaz Aparicio

Introducción

Inmunidad en la brucelosis

Métodos diagnósticos para brucelosis

Pruebas serológicas para *Brucella* spp. en diferentes especies

Prueba de aglutinación lenta en tubo

Lectura de resultados

Prueba de aglutinación en placa

Lectura de resultados

Registro e interpretación de resultados

Prueba de aglutinación en tarjeta o prueba de rosa de Bengala

Lectura de resultados

Interpretación de resultados

Modificación a la prueba de tarjeta para uso en caprinos y ovinos

Inmunodifusión radial con hapteno nativo

Prueba de difusión en gel

Producción de antígeno soluble

Prueba de rivanol en placa

Prueba de fijación de complemento

Microtécnica para la prueba de fijación del complemento

Prueba especial para sueros anticomplementarios

Observaciones

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una zoonosis que puede ser transmitida directa o indirectamente del animal al hombre; la producen las bacterias del género *Brucella*. Se caracteriza por fiebre prolongada, de donde derivan los nombres de fiebre de Malta, fiebre mediterránea y fiebre ondulante.

El género *Brucella* tiene seis especies:

1. *Brucella abortus*: Se reconocen siete bio-variedades. Infecta básicamente a bovinos, también a caprinos y ovinos que conviven con bovinos infectados. En humanos se presenta la infección cada vez con mayor frecuencia; causa enormes pérdidas económicas por mengua de energía y capacidad laboral.
2. *Brucella melitensis*: tiene tres bio-variedades que difieren entre sí por su comportamiento con sueros monoespecíficos anti-A y Anti-M. Causa una enfermedad contagiosa en caprinos y también en bovinos; en el hombre produce una infección severa y persistente.
3. *Brucella suis*: Hay cinco bio-variedades; la uno y la tres infectan a los suinos; las bio-variedades uno, tres y cuatro son altamente patógenas para el hombre.
4. *Brucella neotomae*: Se aisló de ratas del desierto en el noroeste de Estados Unidos.
5. *Brucella ovis*: Causa epididimitis en corderos y ocasionalmente abortos en ovejas; esporádicamente infecta cabras, pero no a otros animales, ni al hombre.
6. *Brucella canis*: Produce epididimitis y orquitis en perros machos, y metritis y abortos en perras. Infecta al hombre que convive con perros infectados.

La afinidad de especies no es definitiva y se pueden producir infecciones por cualquier es-

pecie de *Brucella* en cualesquier especie animal. Las especies *Brucella ovis* y *Brucella canis* son cepas rugosas que no cruzan con cepas lisas. Esto significa que con antígenos de *Brucella abortus* no se puede evidenciar la presencia de anticuerpos de *B. ovis* o de *B. canis*. Asimismo, la serología positiva a *B. abortus* sólo indica infección por una especie lisa (*B. abortus*, *melitensis* o *suis*), y no define la especie particular.

La incidencia de la brucelosis sobre el ganado es de vital importancia, debido a las enormes pérdidas económicas que produce, a causa de los abortos, las pérdidas en la producción de leche, la infertilidad y la esterilidad consecuentes, con notorio retraso en el desarrollo de los hatos.

En el hombre produce incapacidad laboral, con la consiguiente pérdida económica, por lo que se le considera en el marco de las enfermedades profesionales; su distribución es mundial. En México, la brucelosis más común en humanos es la *melitensis* (85%), aunque en los últimos años el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición ha descrito un incremento en la frecuencia de *Brucella abortus*.

Según la Dirección General de Epidemiología de México, los Estados del País con mayor incidencia de brucelosis en humanos son: Guanajuato, Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí, Coahuila, Durango, Nuevo León, Zacatecas, Hidalgo, Puebla, Querétaro, México, y Oaxaca.

INMUNIDAD EN LA BRUCELOSIS

En la brucelosis se presentan tres tipos de fenómenos inmunológicos:

1. Durante los primeros días de la infección se producen anticuerpos del tipo de las inmunoglobulinas M e inmunoglobulinas G, que pueden ser demostrables por pruebas serológicas de aglutinación, precipitación y de fijación del complemento.
2. Las bacterias del género *Brucella* ejercen un parasitismo intracelular en células del sistema retículo-endotelial y tejido hematopoyético, produciendo inmunidad celular.
3. Cuando la infección se hace crónica se produce un estado de alergia, el que también se usa como diagnóstico. El procedimiento más utilizado es el de intradermo-reacción, con extractos purificados de *Brucella melitensis*, *abortus* y *suis* (MBP).

Existen vacunas elaboradas con cepas atenuadas, como la 19 de *B. abortus*, la Rev. 1 de *B. melitensis* y la cepa 2 de *B. suis* (no disponible en México), así como bacterinas con adyuvantes oleosos, como la 45/20 y la H 38 (no disponibles en México), las cuales se han utilizado para prevenir la brucelosis; sin embargo, cada vacuna presenta ventajas e inconvenientes

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA BRUCELOSIS

El diagnóstico concluyente es el etiológico, que consiste en el aislamiento de la bacteria por cultivo a partir de órganos del feto (aparato digestivo, pulmón y nódulos linfáticos) y leche (véase la página 112 del capítulo sobre enfermedades bacterianas). En el hombre se hace un diagnóstico temprano por hemocultivo o mielocultivo, durante los procesos febriles, sembrando la sangre o la médula ósea en medios específicos.

El diagnóstico serológico es el más útil, tanto en medicina veterinaria como en medicina humana. Las pruebas más usadas son de anillo en leche (anillo de Bang), de aglutinación lenta en tubo, de tarjeta o de rosa de Bengala, de rivanol, mercaptoetanol y difusión en gel. La prueba de aglutinación en placa (Huddleson) ha caído en desuso al verse reemplazada por técnicas más sensibles y específicas.

Una prueba complementaria de gran utilidad diagnóstica es la de fijación del complemento.

En las pruebas de rutina los anticuerpos que se generan en respuesta a la infección con especies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) reaccionan y cruzan con antígenos de especies lisas, debido a que comparten los antígenos A y M. Esta es la razón por la que las pruebas de aglutinación en tubo, placa, tarjeta, fijación de complemento y anillo en leche son realizadas con el antígeno de *Brucella abortus*, cepa 1119-3.

Los anticuerpos que se producen en respuesta a la infección con especies rugosas de *Brucella* (*B. ovis* y *B. canis*), reaccionan y cruzan con antígenos hechos con cualquiera de estas dos especies.

Para evidenciar la presencia de anticuerpos de *B. ovis* y *B. canis* se puede emplear antígeno de *B. Canis*, elaborado a partir de cultivos no mucoides.

PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA BRUCELLA SPP. EN DIFERENTES ESPECIES

Prueba de aglutinación lenta en tubo

Se emplea antígeno de *Brucella abortus* 1119-3, al 4.5% de células. Se diluye el antígeno 1:100 con solución salina fenolada. Con pipeta de 0.2 ml graduada en centésimas y milésimas de mililitro, agregar el suero problema en cinco tubos de 13x100, respectivamente 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml. Por cada lote de prueba se emplea un control positivo y uno negativo. Con jeringa automática se agrega 2 ml de antígeno diluido a cada tubo, se agita y se incuba durante 48 horas a 37 °C (diluciones finales del suero en los tubos: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400).

Lectura de resultados

Después del tiempo de incubación, observar los tubos contra un fondo negro opaco, iluminado.

La reacción es positiva (+) si la mezcla suero - antígeno es clara y una agitación suave no deshace los flóculos.

Positiva incompleta (I): La mezcla suero - antígeno es parcialmente clara, y una agitación suave no deshace los flóculos.

Negativa (-): La mezcla suero - antígeno no muestra signo de aclaramiento y una agitación suave revela que no hay flóculos.

Positiva pro-zona: No hay aglutinación o es muy escasa en los tubos con suero menos diluido y es intensa en los más diluidos; se le describe como positiva con el título de la mayor dilución positiva.

Prueba de aglutinación en placa

Se usa antígeno de *Brucella abortus* 1119-3 al 11%, con pH de 6.4 a 7.0, coloreado con verde brillante y cristal violeta⁷⁹; se emplea sin diluir.

Tanto los sueros como el antígeno deben dejarse alcanzar la temperatura ambiente antes de utilizarse. Se emplea una placa de acrílico o vidrio transparente marcada con 60 cuadrados de 4x4 cm.; la placa tiene una medida total de 48x33 cm.

Se considera una columna para cada suero y empezando de arriba se mide en cada cuadrado 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 ml de suero, con pipeta de 0.2 ml graduada en centésimas y milésimas de mililitro.

Con un gotero metálico calibrado para dejar caer 0.03 ml de antígeno, se agrega una gota de éste sobre cada porción de suero.

Con un agitador múltiple de cinco ramas, al que suele llamarse “manita”, se mezcla un grupo de cinco sueros, empezando por el más diluido hacia el más concentrado, extendiendo cada mancha a una circunferencia de 2 cm. de diámetro aproximadamente. Se agita por rotación suave de la placa y se deja en reposo durante 8 minutos, cubierta con la tapa de la caja de lectura, haciendo una agitación intermedia a los 4 minutos; se vuelve a agitar por rotación y

⁷⁹ C.I. 42555, violeta de genciana, violeta básica 3.

se lee contra el fondo negro mate de la caja para lectura de esta prueba que mide 48 x 33 x 12 cm., con iluminación interior por medio de dos focos.

Lectura de resultados

Positiva (+): Aglutinación completa donde los grumos del antígeno aglutinado están separados por líquido claro, como agua.

Positiva incompleta (I): Donde hay aglutinación definida de intensidad variable, sin completa claridad en el líquido que los separa.

Negativa (-): No hay aglutinación

Registro e interpretación de resultados

Tanto en la prueba de aglutinación en tubo como en la prueba de aglutinación en placa, se emplea la siguiente forma de registro:

#	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400		
1	-	-	-	-	-	neg	1:25
2	I	-	-	-	-	neg	1:25
3	+	-	-	-	-	neg	1:25
4	+	+		-	-	sos	1:50
5	+	+	+	-	-	pos	1:100
6	+	+	+	+	-	pos	1:200
7	+	+	+	+	+	pos	1:400

La interpretación de las pruebas de aglutinación en tubo y en placa se expresa en el cuadro siguiente. Depende si el animal fue vacunado oficialmente con vacuna de *B. abortus*, cepa 19. Sólo las hembras se vacunan, porque la cepa vacunal puede causar orquitis y epididimitis.

Cuadro 14. INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN EN TUBO Y EN PLACA DE ACUERDO A LA DILUCIÓN Y SI FUE O NO VACUNADO CON CEPA 19 DE *B. ABORTUS*.

neg = negativa, sosp = sospechosa, pos = reactor positivo.

1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	no vac	vac
-	-	-	-	-	neg	neg
I	-	-	-	-	neg	neg
+	-	-	-	-	neg	neg
+	I	-	-	-	sosp	neg
+	+	-	-	-	sosp	neg
+	+	I	-	-	sosp	sosp
+	+	+	-	-	pos	sosp
+	+	+	I	-	pos	sosp
+	+	+	+	+	pos	pos

Cuadro 15. CONVERSIÓN DE LOS TÍTULOS DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN LENTA EN TUBO A UNIDADES INTERNACIONALES.

Título en tubo	U.I / ml
N 25	< 20
I 25	20
+ 25	26
I 50	40
+ 50	53
I 100	80
+ 100	100
I 200	160
+ 200	212
I 400	320
+ 400	424

Prueba de aglutinación en tarjeta o prueba de rosa de Bengala

Antígeno de *Brucella abortus* cepa 1119-3, al 8%, teñido con rosa de Bengala con pH 3.65 ± 0.05. Se emplea sin diluir. Los sueros y el antígeno deben estar a la temperatura ambiente.

Colocar 0.03 ml de suero en un cuadrado de 4x4 en la placa de acrílico y 0.03 ml de antígeno con gotero metálico calibrado para 0.03 ml; mezclar con agitador de “manita”. Agitar durante 4 minutos por rotación, después leer los resultados.

Lectura de resultados

Negativo (-): Color rosado uniforme sin aglutinación, ni formación de ceja.

Positiva (+): Aglutinación apenas perceptible y/o formación de ceja.

Positiva (++) : Aglutinación fina, con una ceja definida y alguna claridad.

Positiva (+++) : Aglutinación tosca, con aclaramiento definido.

Interpretación de resultados

Si la prueba se está usando como prueba de tamiz, cualquier grado de positividad, es decir, una (+), sugiere que se debiera practicar una prueba complementaria, como la de rivanol.

Si la prueba es presuntiva, la aglutinación definida indica un resultado positivo.

Una reacción de una (+), dependiendo de la presencia de una ceja, sin aglutinación detectable, se deberá considerar sospechosa y se ensayará con una prueba complementaria.

Modificación a la prueba de tarjeta para uso en caprinos y ovinos

La baja sensibilidad del antígeno de rosa de Bengala para el diagnóstico de brucelosis causada por *Brucellas* lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, etc.) en caprinos y ovinos es un problema para el diagnóstico, ya que al ser la tarjeta la prueba tamiz recomendada, debe tener una sensibilidad cercana al 100%, con un mínimo de falsos negativos; porque si bien los sueros positivos a la prueba de tarjeta se confirman con otras técnicas, los negativos a tarjeta se dan con seguridad como tales sin comprobación posterior.

Al disminuir a 3% la concentración celular de la cepa de *B. Abortus* 1119-3 al preparar el antígeno, aumenta la sensibilidad de la prueba de tarjeta en caprinos de 79% a 98%, disminuyendo el porcentaje de falsos negativos en un 19%. Los demás procedimientos son iguales a los mencionados anteriormente para la prueba clásica de tarjeta o rosa de Bengala.

Inmunodifusión radial con hapteno nativo

La prueba de inmunodifusión radial se basa en una reacción de precipitación en gel, en la que el antígeno se incluye en el gel y los sueros son colocados en pocillos, desde los que difunden para producir un anillo o halo de precipitación antígeno-anticuerpo.

Esta prueba permite diferenciar las vacas, cabras y ovejas (vacunadas o no) infectadas con *Brucella* de aquellas que han sido vacunadas con vacunas vivas. Su sensibilidad es un poco menor a la fijación del complemento (F.C.), su especificidad en negativos es al menos igual que F.C., pero su especificidad en vacunados es mayor.

Producción del hapteno nativo

Se siembra la cepa *Brucella melitensis* 16 M en matraces con caldo *Brucella* o caldo tripti-caseína - soya; se incuba a 37 °C en agitación durante 48 horas, después se añade a cada matraz 5 ml de fenol al 90%, se agitan e incuban por 24 horas. Las bacterias se cosechan por centrifugación a 7500 G por 15 minutos; se resuspenden en solución salina fisiológica y se recuperan de nuevo por centrifugación. Las células se pesan, se resuspenden en agua destilada a razón de 30 g peso húmedo por 100 ml y se autoclavean a 120 °C por 30 minutos. Se enfrían y centrifugan a 12000 G por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se precipita con tres volúmenes de etanol frío a 4 °C por 18 horas en agitación. Se centrifuga a 5000 G por 15 minutos a 4 °C. Al sobrenadante se le añaden dos volúmenes más de etanol frío y se deja precipitar a -20 °C por 18 horas. Se centrifuga

y resuspende el precipitado en una pequeña cantidad de agua, para después dializarlo y liofilizarlo.

Procedimiento de la prueba de inmunodifusión radial

Solución A (amortiguador de glicina pH 7.8):

Glicina..... 7.13 g
Cloruro de sodio..... 5.73 g
Agua destilada..... 450 ml

- Llevar el pH a 7.8 con hidróxido de sodio 1 N (4 g/100 ml H₂O) y aforar con H₂O a 500 ml.

Solución B (Agarosa):

Agarosa 0.8 g
Azida de sodio..... 50 mg
Agua destilada..... 50 ml

- Calentar el agua; añadir la azida de sodio y la agarosa agitando; calentar a “baño María” (en camisa de agua caliente) a 100 °C hasta que quede transparente y sin grumos.

Solución C (hapteno nativo concentrado):

Hapteno nativo 1 mg
Agua destilada..... cbp 1 ml

- Se prepara suficiente gel para tres placas (tres ml por placa), calculando una concentración final de hapteno nativo de 20 µg / ml:
- Disolver un gramo de cloruro de sodio en cinco ml de la solución A.
- Añadir 200 µl de la solución C a 5 ml de la solución A + cloruro de sodio; mezclar.
- Calentar la mezcla anterior a “baño María” (en camisa de agua caliente) a 60 °C.
- Añadir cinco ml de solución B previamente fundida; mezclar.
- Verter la mezcla con pipeta caliente en las placas a razón de tres ml por placa, o la cantidad que proporcione un espesor del gel de dos mm.

- Dejar solidificar 15 minutos, pero esperar 24 horas antes de emplearlas.

Las placas se pueden almacenar en refrigeración y cerradas, durante 15 días.

Realización de la prueba del hapteno nativo

- Se perforan pocillos con sacabocados a una distancia mínima de 4 mm entre ellos, extrayendo el gel con aguja o pipeta Pasteur conectada a manguera de vacío.
- Se rellenan los pocillos con 10 a 15 µl de suero y se incuban las placas cerradas a temperatura ambiente durante 24 horas.
- Si los sueros son positivos aparecerá un halo o anillo de precipitación alrededor del pocillo.

Prueba de difusión en gel

Producción de antígeno soluble de B. ovis:

Se siembra en botella de Roux con agar - tripticaseína - soya o agar - Brucella con 5% de suero más 10% de CO₂, una cepa de *B. ovis*; se incuba a 37 °C durante 3 a 5 días y se cosecha con 20 ml de solución salina por botella de Roux. Centrifugar las bacterias cosechadas a 6000 r.p.m. durante 40 minutos. Tirar el sobrenadante y resuspender las células en proporción de una parte de células por cuatro de solución salina. Repetir el lavado dos veces.

El antígeno es extraído por calor en autoclave a 120 °C (15 libras/pulgada²) durante 20 minutos; dejar enfriar y centrifugar a 6000 r.p.m. durante 40 minutos.

Separar el sobrenadante de los restos celulares y filtrarlo por una membrana de 0.22 micras.

Dializar a través de varios cambios de agua deionizada durante 48 horas, para remover la actividad anticomplementaria; almacenar en alícuotas pequeñas a -70 °C; o bien, liofilizar.

Preparación del gel

Amortiguador de boratos 0.03 M, pH 8.3:

Ácido bórico	1.86 g
Cloruro de potasio	7.25 g
Agua destilada	950 ml

- Disolver y ajustar el pH a 8.3 con solución 0.2 M de hidróxido de sodio.
- Aforar la solución a un litro.

Gel de agarosa:

Agarosa	0.8 g
Amortiguador de borato	5 ml
Cloruro de sodio al 5%	93 ml

- Disolver calentando en “baño María” (en camisa de agua caliente).
- Agregar un ml de azida de sodio al 1% y servir en cajas Petri de plástico a una altura de tres a cuatro mm.
- Cuando solidifica el gel, se cortan los pozos.

Es conveniente emplear un molde estándar de seis pozos alrededor de un pozo central, de cuatro mm de diámetro y separados cinco mm. La prueba se puede adaptar a porta-objetos y a otros moldes.

Concentración óptima del antígeno para la prueba de difusión en gel

Reconstituir cinco mg de antígeno liofilizado en 1 ml de agua y efectuar cinco diluciones dobles. Si el antígeno está en forma líquida, hacer diluciones semejantes.

Con micropipeta colocar 10 microlitros de suero positivo de borrego naturalmente infectado con *B. ovis* en el pozo central de un molde de gel y un suero positivo de un borrego o de una cabra naturalmente infectada con *B. melitensis* en el pozo central de otro molde de gel.

Colocar las diluciones del antígeno en los pozos que rodean al pozo central de los dos moldes. Colocar las cajas o los porta-objetos en una cámara húmeda (una caja de plástico con tapa con una porción extendida de algodón humedecida con agua). Dejar 24 horas a temperatura ambiente. Examinar la concentración

de antígeno que muestre la línea de precipitación con el suero de *B. ovis* y que no muestre líneas con el suero de *B. melitensis*. Esta será la solución que se usará en la prueba diagnóstica.

Procedimiento de la prueba de difusión en gel

Llenar el pozo central con antígeno líquido a su concentración óptima. Colocar muestras de suero sin diluir en los pozos que rodean al pozo central. Se debe incluir un suero positivo cada día de prueba.

Dejar incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente. Normalmente se desarrollan líneas de precipitación dentro de las 24 horas; pero se deberá examinar la prueba después de dos o tres días si no apareció a las 24 horas. La lectura se hace en un transiluminador para resaltar las líneas de precipitación.

Resultado

Se forman líneas de precipitación entre el pozo central que contiene el antígeno y el o los pozos que rodean al pozo central, que contienen los sueros problema o un suero control positivo.

Prueba de rivanol en placa

Reactivos

Antígeno de *Brucella abortus* 1119-3 para la prueba de rivanol en placa. Solución de rivanol al 1%, peso a volumen (P/V): 1 gramo de rivanol (lactato de 2 ethoxy - 6, 9 - diamino - acridina) se disuelve en 100 ml agua destilada estéril, mezclando en agitador magnético durante 1 hora. Envasar en forma estéril en frascos pequeños de color ámbar y almacenar en la obscuridad.

La solución de rivanol precipita selectivamente IgM de suero, que se separa por centrifugación; en el sobrenadante se efectúa la prueba de aglutinación en placa.

Procedimiento de la prueba de rivanol

Dejar que los sueros y los reactivos, incluyendo el antígeno, alcancen la temperatura ambiente.

En tubos de 13x100 mm, medir 0.4 ml de solución de rivanol al 1% y agregar 0.4 ml de suero sin diluir, mezclar inmediatamente, dejar en reposo durante media hora (no dejar que llegue a una hora). Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. Con el sobrenadante de color amarillo claro se efectúa la prueba. Medir en cada uno de los cuadros de 4x4 cm, en una columna de 5 cuadros: 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 de sobrenadante de cada suero con pipeta de 0.2 ml graduada en centésimas y milésimas de ml, en una placa de acrílico. Agregar 0.03 ml de antígeno para la prueba de rivanol, con gotero metálico calibrado. Mezclar con agitador múltiple de "manita", empezando por los más diluidos, extendiendo cada mezcla dos cm de diámetro aproximadamente. Mezclar inclinando la placa hacia un lado y otro suavemente, a la vez que se hace girar con movimiento de rotación, durante cuatro veces y dejar reposar durante seis minutos cubriendo la placa. Volver a hacer girar la placa en cuatro ocasiones y dejar reposar otros seis minutos. Girar nuevamente en cuatro ocasiones y leer los resultados contra el fondo negro mate de la caja iluminada utilizada para la lectura de la prueba de aglutinación en placa.

Resultados

Positiva (+): Hay aglutinación completa y los grumos formados están separados por líquido claro.

Positiva incompleta (I): Hay aglutinación definida, pero no hay claridad completa en el líquido que separa los grumos.

Negativa (-): No hay aglutinación.

El resultado se expresa como positivo, seguido del título del suero en que ocurre la reacción descrita, o negativo.

Interpretación de la prueba de rivanol

En animales no vacunados se considerará positiva una aglutinación completa 1:25 y en animales vacunados se considerará sospechosa. Una aglutinación completa 1:50 será positiva.

Prueba de fijación de complemento

Charles Bordet demostró que el suero fresco contiene un sistema de proteínas séricas funcionalmente ligadas que interactúan unas con otras para producir hemólisis, entre otras funciones. Demostró también que al calentar el suero a 56 °C se pierde la acción hemolítica. A este sistema termolábil le llamó complemento.

La prueba de fijación del complemento es muy usada para el diagnóstico de brucelosis en bovinos, caprinos, ovinos, equinos y suinos; también en humanos.

En los rumiantes, el anticuerpo principal que fija el complemento es IgG1. El anticuerpo IgG2 no fija el complemento, y es capaz de evitar la fijación del complemento por otras inmunoglobulinas, produciendo un fenómeno de positividad pro-zona, que consiste en que en las primeras diluciones es negativa o débilmente positiva y en las diluciones mayores es intensa. Se describe como positiva con el título correspondiente a la mayor dilución positiva.

La prueba de fijación del complemento consta de dos etapas: La primera consiste en que la mezcla del antígeno y el anticuerpo tienen la propiedad de unirse con una cantidad exacta de complemento. Esta combinación no produce reacciones fácilmente demostrables; es necesario agregar, después del período de fijación del complemento, un indicador adecuado. Este indicador es el glóbulo rojo de carnero sensibilizado con hemolisina específica.

Si el complemento ha sido fijado en la reacción primaria, ya no queda complemento disponible para lisar los glóbulos rojos sensibilizados del sistema indicador; no se produce hemólisis y esto representa una prueba positiva, es decir, el suero contiene anticuerpos

contra *Brucella*. Por otra parte, si no se fija el complemento en la reacción primaria, queda en disponibilidad para reaccionar con los glóbulos rojos de carnero sensibilizados y se produce la hemólisis, lo que representa una prueba negativa.

Materiales y reactivos

Tubos de 13x100, gradillas para tubos, microplacas de poliacrílico (*microtiter*), pipetas de gota de 25 μ l, pipetas serológicas de 1, 2, 5 y 10 ml, micropipetas de volumen ajustable en microlitros, "baño María" (con camisa de agua caliente), espejo lector, centrífuga con cabezal para microplacas.

Diluyente: Solución de cloruro de sodio amortiguada con veronal (SAV): 83 g de cloruro de sodio, 10.19 g de barbiturato de sodio, 34.58 ml de ácido clorhídrico 1 N, 5 ml de solución concentrada de calcio y magnesio (*véase más adelante*). Disolver en agua destilada en matraz aforado de dos litros y aforar. Debe tener pH entre 7.3 y 7.4. Esta es una solución concentrada cinco veces, la cual se envasa en viales con 40 ml y almacena en refrigeración. Para usarla, diluir un frasco de 40 ml en 160 ml de agua destilada enfriada en hielo; mantenerla en hielo (no más de 24 horas) mientras se use.

Solución concentrada de calcio y magnesio

20.33 g de cloruro de magnesio hexahidratado y 4.41 g de cloruro de calcio dihidratado. Disolver con agua destilada en matraz aforado de 100 ml y aforar; distribuir en viales con seis ml y conservar en refrigeración.

Solución de Alsever

Anticoagulante y preservativo para la sangre de carnero: 1.866 g de glucosa anhidra, 0.418 g de cloruro de sodio, 0.800 g de citrato de sodio, 0.055 g de ácido cítrico. Disolver en agua destilada y aforar a 100 ml. Esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μ m o en autoclave a 10 libras durante 20 minutos.

Se emplean partes iguales de solución de Alsever y de sangre de carnero y se mezclan. Dejar madurar durante cinco días en refrigeración antes de usar los glóbulos rojos; después pueden ser usados hasta los 60 días. Para usarlos se ponen 10 ml de glóbulos rojos y se lavan dos veces por centrifugación con SAV a 2000 r.p.m. durante cinco minutos, en tubos de 50 ml llenos con SAV, y un tercer lavado en tubo de 15 ml lleno con SAV a 2000 r.p.m. durante diez minutos.

Complemento

Suero de varios cuyes, separado tan pronto como sea posible en centrífuga refrigerada. Se reúnen todas las fracciones y se reparten en viales de un ml con 0.25 y 0.50 ml; los que se conservan en congelación a -70 °C. También se puede liofilizar y conservar en refrigeración a 4 °C.

Hemolisina: Es suero hiperinmune de conejo anti-glóbulos rojos de carnero. Se consigue comercialmente, diluido al 50% con glicerol. Se conserva en refrigeración a 4 °C.

Estandarización de la suspensión de glóbulos rojos al 2%: Después de lavados los glóbulos rojos (G.R.), se suspende un ml en 42 ml de SAV.

Se calibra el espectrofotómetro a cero con agua destilada, a una longitud de onda de 540 nm.

En tubos con 3.4 ml de agua destilada agregar 0.6 ml de suspensión de glóbulos rojos. Leer la densidad óptica (D.O.), empleando agua destilada como blanco. Ajustar la concentración al 2% aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{diluyente} = \frac{\text{D.O. suspensión} - \text{D.O. 2\%}}{\text{D.O. 2\%}} * \text{volumen por agregar de la suspensión}$$

Por ejemplo:

$$\text{D.O. de la suspensión} = 0.71$$

$$\text{D.O. de la suspensión al 2\%} = 0.6 \pm 0.005$$

$$\text{Volumen de la suspensión} = 43 \text{ ml}$$

$$\text{diluyente} = \frac{0.71 - 0.6}{0.6} * 43 \text{ ml} = 7.9 \text{ ml}$$

por agregar

Agregar 7.9 ml de SAV y volver a valorar la D.O. que debe ser de 0.6 (±0.005).

Titulación del complemento

- a). Preparar y estandarizar una suspensión de G.R. al 2%.
 - b). Preparar una solución concentrada de complemento 1:10 y conservar en refrigeración.
 - c). Preparar una dilución de titulación del complemento con SAV, que puede ser 1:200, 1:400, etc.
 - d). Preparación de una dilución 1:200 de complemento:
- Agregar 0.1 ml de complemento diluido 1:10 a 1.9 ml de SAV frío.
- e). Titulación del complemento.

Incubar a 37 °C 30 minutos, agitando ligeramente a los 15 minutos.

Retirar del “baño María” y agregar 2 ml de SAV frío a cada tubo.

Centrifugar a 2000 r.p.m. durante cinco minutos. Leer la D.O. a 540 nm, empleando SAV como blanco. Calcular el porcentaje de hemólisis en cada tubo.

$$y = \% \text{ de hemólisis} = \frac{\text{D.O.} * 100}{\text{D.O. suspensión al 2\%}}$$

Ejemplo:

D.O. = 0.2
 D.O. de la suspensión al 2% = 0.6

$$y = \% \text{ de hemólisis} = \frac{0.2 * 100}{0.6} = 33\%$$

Calcular los valores de Y/(100 -Y). Graficar dosis de complemento *versus* Y/(100 -Y) en papel logarítmico en ambos ejes (*véase más adelante*).

Cuadro 16. TITULACIÓN DEL COMPLEMENTO (ML).

Tubos	1	2	3	4	5	6
-------	---	---	---	---	---	---

Y / (100 - Y)

0.1											1
compl 1:200	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8					
SAV	1.2	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7					
G.R. sens.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5					

TITULACIÓN DEL COMPLEMENTO (cálculo de C'H ₅₀)				
tubo #	dosis de C' (ml)	D. Óptica (540 nm)	% hemólisis	Y/(100-Y)
1	0.3			
2	0.4			
3	0.5			
4	0.6			
5	0.7			
6	0.8			

Localizar la intersección de la línea vertical 1 con la curva, punto que corresponde al 50% de hemólisis. Localizar en el eje de las ordenadas la dosis de complemento. Se emplean cinco dosis hemolíticas de complemento al 50% (**5 C'H₅₀**) en la prueba.

Cálculo de la dilución de trabajo X

El volumen de titulación del complemento es $2 \times 0.25 = 0.5$ ml (dos veces el volumen estándar de la macro-reacción). La dilución de la titulación del complemento es 200 sobre 5 dosis hemolíticas de complemento al 50% (5×0.42)

Factor de dilución X

$$200 : (5 * 0.42) :: X : 0.5$$

$$X = \frac{200 * 0.5}{5 * 0.42} = \frac{100}{2.1} = 47$$

Como se partió de la dilución diluida de complemento 1:10, la dilución de esta solución diluida será: $47/10 = 4.7$

La dilución diluida de complemento diluida 1:10 debe ser diluida 4.7 veces, para llevarla a la dilución de 1:47 que se requiere para usarla en la prueba diagnóstica.

Titulación de la hemolisina

A) Suspensión estándar de glóbulos rojos al 2%.

B) Dilución 1:10 del complemento.

C) Dilución de titulación del complemento: 1:200

D) Dilución 1:100 de la hemolisina

Cuadro 17. PREPARACIÓN DE DILUCIONES DE HEMOLISINA.		
<i>Cantidad</i>	<i>Diluyente</i>	<i>[Final]</i>
1 ml (1:100)	+ 4 ml SAV	1:500
3 ml (1:500)	+ 3 ml SAV	1:1000
1 ml (1:1000)	+ 0.5 ml SAV	1:1500
1 ml (1:1000)	+ 1 ml SAV	1:2000
1 ml (1:1000)	+ 2 ml SAV	1:3000
1 ml (1:1000)	+ 3 ml SAV	1:4000
1 ml (1:1000)	+ 4 ml SAV	1:5000
1 ml (1:5000)	+ 1 ml SAV	1:10000

E) A partir de la dilución 1:100 de hemolisina hacer diluciones crecientes según se detalla a continuación.

Sensibilización de GR.

En una gradilla con ocho tubos agregar un ml de glóbulos rojos estandarizados en cada tubo; agregar un ml de cada dilución de hemolisina a cada uno de los ocho tubos con glóbulos rojos; mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 15 minutos, para que ocurra la sensibilización de los glóbulos rojos, agitando cada 5 minutos.

Titulación por duplicado

Colocar en una charola con hielo y agua, una gradilla con dos series de ocho tubos de 15x100 mm.

Por duplicado, agregar a cada tubo un ml de diluyente SAV y 0.5 ml de complemento a la dilución de titulación (1:200). Agregar en forma progresiva de dilución 0.5 ml de G.R. sensibilizados; mezclar bien. Incubar en "baño María" (en camisa de agua caliente) a 37 °C durante 30 minutos, agitando ligeramente a los 10 y 20 minutos. Sacar los tubos del "baño María", agregar 2 ml de SAV frío y centrifugar a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. Leer la D.O.

del sobrenadante, en el espectrofotómetro a 540 nm, calibrando a cero con SAV como blanco.

Calcular el % de hemólisis en cada tubo

La D.O. correspondiente a 100% de hemólisis es 0.6, y si en un tubo se encontró una D.O. de 0.21, el % de hemólisis será:

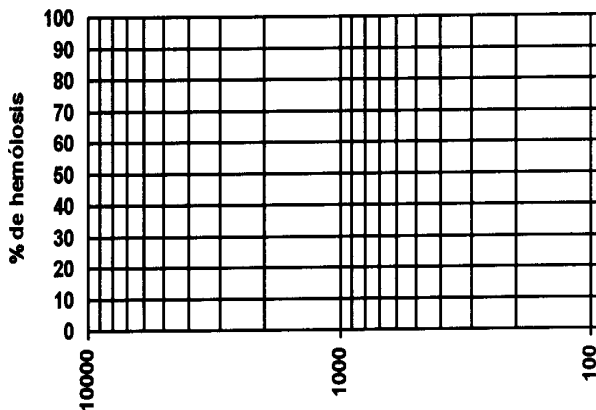
$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{0.21 * 100}{0.6} = 35 \%$$

Graficar el porciento de hemólisis en papel cuadrado de 2 cm por lado. Se determina el valor de las abscisas así: A partir del origen hacia la derecha se marca un punto en el décimo cuadrado que corresponde al valor 500 de la dilución. El punto 1000 se determina dividiendo 500 entre el recíproco de la dilución.

$$500/1000 = 0.5$$

$$\text{Para } 5000, 500/5000 = 0.1$$

Trazar la curva. A partir de cierto valor, la gráfica tiende a una recta horizontal, lo que indica que los valores son casi iguales (curva de me-



seta). Agregar 25% al valor límite y este será la dilución de la hemolisina a emplear en la prueba.

Antígeno para la fijación de complemento

El antígeno que se emplea en la prueba de fijación del complemento es el que se usa para la prueba de aglutinación lenta en tubo; se diluye 1:200 con SAV frío.

Inactivación del complemento

El suero fresco contiene complemento y también presenta actividad anticomplementaria; esta actividad anticomplementaria se puede incrementar por la proliferación de bacterias si no se conserva el suero en congelación; se reduce por centrifugación al eliminar el paquete bacteriano.

El poder hemolítico del complemento se elimina por calentamiento (inactivación). El suero humano se inactiva a 56 °C, el de rumiantes a 58-60 °C. La inactivación debe hacerse como paso previo a la prueba diagnóstica, durante 30 minutos.

La reacción de fijación del complemento y las inmunoglobulinas IgM e IgG

Si los sueros son inactivados a 58-60 °C, la prueba detecta las gamaglobulinas IgM e IgG. Si se calientan a 65 °C se inactivan las inmunoglobulinas IgM y la reacción podrá ser:

Negativa, si fue positiva al inactivar a 58-60 °C, y negativa al inactivar a 65 °C, se considera una respuesta inmune a la vacunación.

Positiva, si fue positiva a las dos pruebas, se considera una respuesta inmune a la enfermedad natural, ya que las gamaglobulinas IgG son termoestables.

Microtécnica para la prueba de fijación del complemento

Las microplacas tienen 96 pozos de fondo en U, dispuestas en ocho hileras de 12 pozos; en la parte superior se marcan del 1 al 12 las columnas de ocho pozos; del lado izquierdo se señalan con letras de la "A" a la "H", ocho hileras de 12 pozos.

Preparar, estandarizar y/o titular cada uno de los reactivos para la prueba:

- Preparar SAV a la dilución de trabajo.
- Preparar y estandarizar G.R. al 2%.

- c). Diluir complemento 1:10 y a la dilución de titulación; titular el complemento.
- d). Diluir y titular la hemolisina; preparar hemolisina a la dilución óptima según titulación.
- e). Sensibilizar glóbulos rojos al 2% con hemolisina a la dilución óptima determinada, a volúmenes iguales. Dejar reposar 15 minutos para la sensibilización de los glóbulos rojos.
- f). En tubos de 13x100 mm se diluye el suero con SAV 1:4. Se inactiva por calentamiento en "baño María" (en camisa de agua caliente) a 58-60 °C, durante media hora, el día de la prueba.
- g). Se requiere emplear un suero control positivo de bajo título, que se puede conservar en congelación en alícuotas pequeñas.
- Descripción de la prueba** (*véanse los cuadros 18 y 19*): Se emplean 25 microlitros de cada reactivo, con volumen total de 0.1 ml.
- I. Distribuir el suero diluido 1:4 e inactivado; en los pozos de las hileras "A", "B" y "H" (25 microlitros), incluyendo los sueros controles (+) y (-).
- II Distribuir 25 microlitros de SAV en los pozos de las hileras de la "B" a la "H".
- III. Mezclar y diluir los sueros en los pozos de "B" a "G", desechando la última porción de 25 microlitros. La dilución se puede hacer por medio de un dilutor de 25 microlitros o con una micropipeta multicanal (de 12 canales) de 25 microlitros (diluciones finales A, 1:4; B, 1:8; C, 1:16; D, 1:32; E, 1:64; F, 1:128; G, 1:256; H, 1:4).
- IV. Agregar 25 microlitros de antígeno diluido 1:200 a todos los pozos de las hileras "A" a "G". Los sueros de la hilera "H" no llevan antígeno; son testigos del suero o testigos anticomplementarios.
- V. Agregar 25 microlitros de complemento que contengan 5 C'H₅₀ a todos los pozos. Agitar golpeando suavemente los bordes de la placa.
- VI. Llenar los pozos de los controles de la reacción, usando un solo pozo por control.
- a) Testigo del antígeno: 25 microlitros SAV, 25 microlitros antígeno; 25 microlitros 5 C'H₅₀.
- b) 5 C'H₅₀: 25 microlitros de complemento + 50 microlitros de SAV.
- c) 2.5 C'H₅₀: 25 microlitros de complemento diluido 1:2 + 50 microlitros de SAV.
- d) 1.25 C'H₅₀: 25 microlitros de complemento diluido 1:4 + 50 microlitros de SAV.
- e) Control del sistema hemolítico: 75 microlitros de SAV.
- f). Control de glóbulos rojos: 75 microlitros de SAV.
- VII.- Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
- VIII.- Distribuir 25 microlitros de G.R. sensibilizados a todos los pozos excepto el pozo (F) que lleva 25 microlitros de G.R. al 1% (G.R. al 2% diluidos 1:1).
- IX.- Incubar a 37 °C durante 30 minutos, agitando a los 10 y a los 20 minutos.
- X.- Extraer del "baño María" y centrifugar las placas a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. Si no se tiene cabezal para microplacas, dejarlas tapadas durante 2 horas en refrigeración a 4 °C.

XI.- Leer resultados con ayuda de un espejo lector:

Positiva (++++) Botón de glóbulos; sobrenadante incoloro.

Positiva (+++) Botón de glóbulos; sobrenadante con 25 % de hemólisis.

Positiva (++) Botón de glóbulos; sobrenadante con 50% de hemólisis

Positiva (+) Pequeño botón de glóbulos; sobrenadante con 75% de hemólisis.

Negativa (-) Hemólisis total (100%)

El suero del pozo "H" (testigo del suero o testigo anticomplementario) debe dar 100 % de hemólisis. Si no da hemólisis o da hemólisis parcial, el suero es anticomplementario y no debe tomarse en cuenta el resultado de la reacción.

Los casos de positividad pro-zona, describirlos como positivos a la mayor dilución positiva.

Cuadro 18. MICROTÉCNICA PARA FIJACIÓN DE COMPLEMENTO. cada columna de la A a la H un suero				
			dilución del suero	
A	Suero 1:4 SAV	25 µl 0 µl	1:4	Ag 25 µl C' 25 µl
B	Suero 1:4 SAV	25 µl 25 µl	1:8	Ag 25 µl C' 25 µl
C	Suero 1:8 SAV	25 µl 25 µl	1:16	Ag 25 µl C' 25 µl
D	Suero 1:16 SAV	25 µl 25 µl	1:32	Ag 25 µl C' 25 µl
E	Suero 1:32 SAV	25 µl 25 µl	1:64	Ag 25 µl C' 25 µl
F	Suero 1:64 SAV	25 µl 25 µl	1:128	Ag 25 µl C' 25 µl

Cuadro 18. MICROTÉCNICA PARA FIJACIÓN DE COMPLEMENTO.
cada columna de la A a la H un suero

			dilución del suero	
G	Suero 1:128 SAV	25 µl 25 µl	1:256	Ag 25 µl C' 25 µl
H	Suero 1:4 SAV	25 µl 50 µl	1:4	Ag 0 µl C' 25 µl

Prueba especial para sueros anti-complementarios

Centrifugar el suero a 4000 r.p.m. por 40 minutos y diluir el suero anticomplementario 1:4 con complemento al 5%. Incubar a 37 °C durante una hora; inactivar a 58-60 °C durante 30 minutos; después continuar la prueba en la forma usual.

Cuadro 19. CONTROLES DE LOS REACTIVOS.

testigo de ⇒	T Ag	T C'	T C''	T C'''	T Sist hemol	T G R
suero	-	-	-	-	-	-
SAV	25 µl	50 µl	50 µl	50 µl	75 µl	75 µl
Ag	25 µl	-	-	-	-	-
C'	25 µl	25 µl 5 C'H 50	25 µl 2 C'H 50	25 µl 1 C'H 50	-	-

OBSERVACIONES

Algunas de las enfermedades mencionadas en este capítulo están en etapa de control o erradicación en los diferentes países de Latinoamérica, por lo que la producción e importación de antígenos está regulada por las autoridades de Sanidad Animal correspondientes. De igual forma, debe consultarse la legislación local para la comunicación de los casos sospechosos de enfermedades de notificación obligatoria.

LECTURAS RECOMENDADAS

Altón, G.G, Jones, L.M, Angus, R.D, & Berger, J.M.: *Techniques for the brucellosis laboratory.* FAO / OMS -WHO- Institute National de la Recherche Agronomique, Paris, 1988.

- Amon, C.: Standardized complement fixation for bovine brucellosis. *Aust. Vet. J.* 53:390-400, 1977.
- Anónimo: *Serologic Microtitration Techniques*. National Veterinary Services Laboratories. U.S. Department of Agriculture. Ames, Iowa, U. S. A, 1981.
- Anónimo: *Technical manual for diagnosis of animal disease*. Japan International Cooperation Agency. Japan, 1983.
- Ciprián, C.A.; Mancera, M. A.; Flores, C. R. y Ramírez, P.C.: Serodiagnóstico de brucelosis. En: Morilla, G. A. y Bautista, G.R. (editores): *Manual de Inmunología*. Diana, México, 1986
- Cottral, G. E.: *Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology*. Cornell University Press. Ithaca, 430-436, 1978.
- García - Carrillo, C.: *La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana*. Oficina Internacional de Epizootias, México, 207-218, 1987.
- Jones, L. M, Dubray, G. y Marly, J.: Comparison of methods of diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Ann. Rech. Vet* 11:-22, 1975.
- Myers, D.M, Varela-Díaz, V.M. & Coltorti, E.A.: Comparative sensitivity of gel-diffusion and tube agglutination tests for the detection of *Brucella canis* antibodies in experimentally infected dogs. *Appl. Microbiol.* 28: 1-4, 1974.

Diagnóstico de leptospirosis

Luis Pedro Moles y Cervantes
Dolores G. Gavaldón Rosas

Introducción

Observación de *Leptospira*

Fase leptospirémica

Observación directa en campo oscuro

Sangre

Orina

Órganos

Histología

Aislamiento de *Leptospira*

Medios de cultivo

Inoculación en animales

Fase leptospirúrica

Serología

Aglutinación microscópica

Interpretación de resultados

Otras técnicas para diagnóstico de leptospirosis

Observaciones

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

Para el diagnóstico de la leptospirosis, es importante tener presente que es una enfermedad producida por una espiroqueta del género *Leptospira* que se divide en dos complejos:

- uno patógeno o asociado a huésped, llamado *interrogans*
- y otro apatógeno o de vida libre, denominado *biflexa*.

El complejo *interrogans* está constituido por más de 20 serogrupos y estos a su vez se integran por más de 200 serovariedades.

La leptospirosis puede tener un curso agudo o crónico. El primero se caracteriza por un periodo de incubación de aproximadamente siete días, seguido por una fase **leptospirémica**, cuya duración es de siete a nueve días en promedio. En esta fase, las leptospiras se encuentran en la sangre y varios órganos, de los cuales se puede aislar:

- hígado
- riñón
- pulmón
- cerebro (incluyendo líquido cefalorraquídeo)
- y cámara anterior del ojo, entre otros.

Posteriormente se presenta la etapa crónica, que coincide con la presencia de los anticuerpos circulantes en el suero y puede durar varios meses e inclusive años. A esta fase se le conoce como **leptospirúrica** y es cuando la *Leptospira* se aloja en el riñón.

La gran diversidad de datos clínicos y la ausencia de signos patognomónicos hacen necesaria la confirmación de esta enfermedad por medio del laboratorio. De acuerdo con esta breve información es más fácil entender qué muestras se deben tomar y el tipo de examen que es posible realizar.

Las muestras deben ser tomadas en condiciones de asepsia y procesadas dentro de las siguientes 4 horas de la obtención, para evitar que la *Leptospira* sea destruida por contaminación bacteriana o procesos de autólisis de los tejidos muestreados. Es importante considerar la temperatura y el pH durante todos los procedimientos que se realicen, toda vez que sólo son viables a pH ligeramente alcalino (de 7.2 a 7.4) y resisten temperatura de refrigeración, pero no de congelación.

OBSERVACIÓN DE LEPTOSPIRA

Para la observación de leptospiras se requiere un microscopio con condensador de campo oscuro (*véase la página 55*). La lente objetivo del microscopio debe ser de poco aumento (10X a 16X), de lo contrario las *Leptospira* se

observarán poco nítidas, debido a que presentan movimiento rápido. Es conveniente realizar la búsqueda en por lo menos diez campos ópticos.

FASE LEPTOSPIRÉMICA

El diagnóstico es difícil debido a que el periodo es corto y en muchas ocasiones no se sospecha de la *Leptospira* como causante del cuadro clínico. En esta etapa, el diagnóstico se basa solamente en la identificación de la bacteria.

Observación directa en campo oscuro

Este procedimiento es mencionado frecuentemente en la literatura; tiene la ventaja de ser rápido; la identificación es difícil y requiere de personal altamente experimentado para dar un diagnóstico certero.

Se pueden observar a partir de diferentes muestras:

Sangre

- Se obtiene una muestra, de preferencia sin anticoagulante
- Se deja reposar para la separación del suero (puede centrifugarse a 1800 rpm en una centrífuga clínica durante 15 minutos).
- Se toma una asada del suero y se deposita en el portaobjetos previamente colocado en el microscopio.
- Es necesario diferenciar las *Leptospira* de hilos de fibrina, los que no refractan la luz, no presentan forma de ganchos, ni tienen movimiento.

Orina

- Para obtener orina en forma aséptica debe realizarse una punción vesical, pero si esto no es posible, se puede coleccionar de la segunda mitad de la micción. Para favorecer ésta se recomienda el uso de diuréticos como la furosemida.
- La muestra se centrifuga para eliminar estructuras normalmente presentes.

- Del sobrenadante se toma una asada que se coloca en el portaobjetos para la observación en el microscopio.

Organos

Durante la necropsia de los animales que hayan muerto recientemente, así como de fetos inmediatamente después de ser abortados (véase el capítulo de abortos en la página 22):

- Se hacen improntas de hígado, riñón, pulmón, cerebro y humor acuoso en un portaobjetos
- Se agrega a la impronta una gota de solución salina fisiológica o solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.2-7.4 (véase la página 45) para homogeneizar el tejido y facilitar la revisión.
- Es posible y a menudo preferible, hacer un macerado de los órganos, al que se le agrega un ml de una de las soluciones antes mencionadas, se deja reposar o se centrifuga y se coloca una asada del sobrenadante en el portaobjetos, para la revisión al microscopio.

Histología

Se realiza inclusión en parafina y cortes convencionales con microtomo (véase la página 58), los que se impregnan con una tinción argéntica. Se emplea con mayor frecuencia la técnica de Warthin-Starry. Es indispensable usar un control positivo y otro negativo y se deben hacer observaciones en varios campos ópticos.

La identificación de la *Leptospira* en tinciones argénticas es difícil: se requiere de una buena tinción y de gran experiencia del observador, hay que diferenciar la *Leptospira* de fibras de colágena y restos de membranas celulares. Las leptospiras teñidas tienen un color café negruzco y el tejido es amarillento, se encuentran situadas sobre la superficie del epitelio tubular y presentan forma de "S" con una o dos curvaturas. En ocasiones, las leptospiras se observan claramente y es frecuente que se encuentren agrupadas. Para dar un diagnóstico de leptospirosis, es neces-

rio observar la forma típica. Debe recordarse que muchas bacterias (por ejemplo: *Bacillus pilliformis* y *Nocardia asteroides*), protozoarios y hongos también se tiñen con las tinciones argénticas y pueden observarse en los cortes revisados para diagnóstico de leptospirosis.

Aislamiento de *Leptospira*

Las muestras serán tomadas de sangre, orina y órganos; el manejo de las muestras es el mismo que fue descrito para la observación directa.

Medios de cultivos

Se deben emplear medios bacteriológicos semisólidos; el más recomendado es EMJH, que contiene albúmina bovina. También se utilizan los medios de Korthoff y Fletcher adicionados con suero de conejo. Por la gran dificultad que ofrece el primoaislamiento, debida a la frecuente contaminación bacteriana, se recomienda agregar uno o más antimicrobianos; se han probado muchos, los más empleados son 5 fluorouracilo y sulfato de neomicina.

Otra situación frecuente en las muestras de tejido y orina es la presencia de sustancias tóxicas para la *Leptospira*, por lo que es conveniente inocular una gota de muestra en un tubo de ensaye que contenga 5 ml de medio y a partir de éste realizar dos diluciones décuples.

Los tubos se cultivan a 28-30 °C hasta por 26 semanas antes de descartarlos. Se deberán hacer revisiones periódicas cada dos semanas y los tubos que presenten contaminación se eliminarán. Cuando se identifiquen leptospiras o estructuras móviles semejantes, es necesario inocular nuevamente en medio fresco e incubar hasta obtener un cultivo puro.

Posteriormente la *Leptospira* se debe adaptar a un medio líquido, a través de pases semanales, hasta lograr un buen crecimiento. Para su tipificación, hay que enviarlas a un centro de referencia internacional. Es impor-

tante aclarar que este procedimiento puede durar más de 6 meses.

Inoculación en animales de laboratorio

En aquellos países donde se permite (véase la nota en la página 166), la inoculación de animales susceptibles es uno de los procedimientos más eficientes para aislar leptospiras patógenas. La ventaja que presenta consiste en la eliminación, tanto de microorganismos contaminantes, como restos de tejidos y fluidos de las muestras. Se debe disponer de especies de animales muy susceptibles como hámsters, cobayos o jerbos (*gerbil*) jóvenes, de preferencia recién destetados, que provengan de un bioterio que esté libre de *Leptospira*.

Es deseable inocular dos animales por vía intraperitoneal con un volumen de 0.25 a 1 ml, del sobrenadante de un macerado de órganos, así como de orina o sangre. En caso de ocurrir la infección, el animal puede mostrar signos de la enfermedad a partir del cuarto día y morir entre el sexto y noveno día postinoculación. La serovariedad *hardjo* produce infección, pero no es letal para estas especies animales.

Si los animales no mueren, se deben sacrificar y tomar muestras de sangre, hígado, riñón, pulmón o cerebro, hacer la observación directa e inoculación a otros animales, así como a medio de cultivo. La rutina se repite con los animales inoculados hasta obtener resultados positivos.

FASE LEPTOSPIRÚRICA

Durante esta fase de eliminación de *Leptospira* por la orina, las técnicas serológicas representan una buena opción, además de la observación directa en orina y el aislamiento de tejido renal previamente descritas.

Serología

Se dispone de varias técnicas serológicas, como la aglutinación microscópica (antes llamada aglutinación-lisis) y diferentes tipos de inmunodifusión. De todas éstas, la prueba de aglutinación microscópica es la más

utilizada en los estudios, tanto seroepidemiológicos como diagnósticos. Además, es considerada como prueba de referencia para la evaluación de nuevas técnicas (OPS).

Aglutinación microscópica

Es una prueba tardada y laboriosa. Se requiere de antígenos vivos, que deben ser seleccionados de acuerdo a las leptospiras presentes en la región. Ofrece la gran ventaja de ser específica para cada serovariedad, propiedad indispensable para el diagnóstico de leptospirosis.

La prueba de aglutinación microscópica consiste en enfrentar diferentes diluciones de cada suero problema a los distintos antígenos de *Leptospira*, para determinar, por medio de una reacción de aglutinación, la presencia de anticuerpos y el título contra cada una de las serovariedades que conforman la batería diagnóstica.

Los antígenos deben ser cultivados en medio líquido. Para la resiembra de los mismos, es recomendable que a un tubo con diez ml de medio se le adicione un ml del cultivo y se incuba a 28-30 °C durante cinco a siete días. Los cultivos se revisarán para determinar si hay un buen crecimiento; ocasionalmente pueden presentar aglutinación espontánea y deberán ser eliminados.

Actualmente esta prueba se realiza en microplacas de fondo plano con 96 pozos. Como diluyente del suero se emplea solución amortiguadora de fosfatos (*véase la página 45*).

Inicialmente se realizan 3 diluciones dobles del suero problema, empezando con 1:25. Se coloca en diferentes pozos de la placa un volumen de cada una de las diluciones del suero, así como un volumen igual de los distintos antígenos. Por lo tanto, las diluciones finales del suero son de 1:50 en adelante. Siempre debe utilizarse para cada una de las serovariedades un control positivo con un suero conocido y un control negativo con la serovariedad más diluyente.

La mezcla de suero diluido y Leptospiras vivas se incuba a temperatura ambiente, de una a dos horas, en una cámara húmeda.

Para la lectura de la prueba, se toma con una asa bacteriológica una pequeña cantidad de la suspensión de cada uno de los pozos y se pone sobre un portaobjetos.

La interpretación de la prueba se realiza calculando la desaparición de células (Leptospiras) libres en el campo, así como la detección de la aglutinación, que puede ser en forma de “cabeza de Medusa” o como “red desgarrada”. El valor asignado es en cruces como sigue ⁸⁰:

Negativo	100% de células libres en el campo
+	75% de células libres en el campo y trazas de aglutinación
++	50% de células libres en el campo y aglutinación aparente
+++	25% de células libres en el campo y aglutinación abundante
++++	0 células libres en el campo y gran cantidad de aglutinación

El criterio de lectura de la prueba indica que el título final del suero es la mayor dilución que presenta aglutinación y/o desaparición del 50% de células libres en el campo.

Interpretación de resultados de serología

Se considera que un título de 1:100 o superior tiene valor diagnóstico y títulos superiores a 1:1000 son sugerentes de una infección reciente

En muestras pareadas, el aumento del título en cuatro diluciones de la primera muestra con respecto a la segunda, tomada dos o tres semanas después, indica una infección activa.

⁸⁰ En muchas ocasiones la aglutinación no es fácilmente medible, por lo que es más sencillo detectar la presencia o ausencia de células libres en el campo.

OTRAS TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS

Las técnicas alternativas para el diagnóstico incluyen:

- La identificación de antígenos de *Leptospira* por inmunofluorescencia o inmunohistoquímica (véase la página 87), empleando anticuerpos policlonales contra varios grupos de serotipos.
- Identificación del ADN de la *Leptospira* por medio de sondas o la técnica de PCR (véase el capítulo de biología molecular en la página 92).
- Otras técnicas muy sensibles que detectan la presencia de anticuerpos, como la prueba de *ELISA*.

OBSERVACIONES

La práctica sugerirá modificaciones a los procedimientos para adecuarlos a las necesidades y capacidades de cada laboratorio.

Algunas de las enfermedades mencionadas en este capítulo están en etapa de control o erradicación en los diferentes países de Latinoamérica, por lo que la producción e importación de antígenos está regulada por las autoridades de Sanidad Animal correspondientes. De igual forma, debe consultarse la legislación local para la comunicación de los casos sospechosos de enfermedades de notificación obligatoria.

LECTURAS RECOMENDADAS

Anónimo: *Serologic Microtitration Techniques*.

National Veterinary Services Laboratories. U.S. Department of Agriculture. Ames, Iowa, U.S.A., 1981.

Anónimo: *Technical manual for diagnosis of animal disease*. Japan International Cooperation Agency. Japan, 1983.

Ellis, W.A.: The Diagnosis of Leptospirosis in Farm Animals. in: *The Present States of Leptospirosis Diagnosis and Control*. Martinus Nijhoff Publishers. The Commission of the European Communities, Netherlands, 13-32, 1986.

- Faine S. 1993. *Leptospira and leptospirosis*. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Myers, D.M.: *Manual de Métodos para el Diagnóstico de Laboratorio de la Leptospirosis*, CEPANZO, OPS, OMS. Nota Técnica 30, Martínez, Argentina, 7, 23-27, 1985.
- Saraví, M, Mazzone, G.D. y Mazzone, J.M.: Análisis y Evaluación de la Metodología de Diagnóstico, Prevención y Control de la Leptospirosis. En: *Memorias de la II Reunión Anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico*. A.A.V.D., 7-14, 1987.

Toma y envío de muestras para diagnóstico de enfermedades virales

*Humberto Ramírez Mendoza
Dante González Salazar
Moisés Fraire Cachón
Germán Valero Elizondo
Juan I. Monroy Basilio
Juan García García*

Introducción

Obtención de la muestra

Muestras de cadáver

Muestras de líquidos

Muestras de articulaciones

Preservación de las muestras

Envío de muestras al laboratorio

Observaciones

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

La identificación de virus es el procedimiento más difícil para determinar la etiología de las enfermedades infecciosas. En muchos casos el estudio de virus es retrospectivo; esto es: el resultado definitivo se conoce después que ha pasado la fase aguda de la enfermedad y el animal se ha recuperado o ha muerto. Este tipo de diagnóstico sirve con frecuencia para confirmar una impresión clínica u obtener los datos epidemiológicos necesarios para controlar la enfermedad dentro de una explotación pecuaria.

La dificultad para el diagnóstico de las enfermedades virales está en relación con las características biológicas de los agentes. Los virus son parásitos intracelulares obligados y todo sistema que esté diseñado para propagar los agentes *in vitro* debe incluir células vivas. En general los virus son específicos de especie, y esta especificidad se extiende a nivel celular. Por eso, la elección de un substrato para el cultivo de virus depende de la especie animal que esté siendo investigada; a diferencia de los agentes bacterianos, en los que la elección del medio sólo depende de las necesidades de los organismos.

El momento óptimo para la recolección de muestras dependerá de la presencia o ausencia del virus. Cuando están presentes los signos clínicos, lo importante es detectar al agente infeccioso, principalmente a través del aislamiento. También se puede identificar la presencia del virus a través de la detección de antígenos por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (*véase la página 87*); observación del virus por microscopía electrónica (*página 104*); y observación de lesiones a la necropsia (*página 15*) e histopatología (*página 58*). La presencia de cuerpos de inclusión (*página 158*) puede ser diagnóstica de muchas enfermedades virales.

Cuando aún no se ha presentado el brote clínico, o cuando ya no se manifiestan signos clínicos de infección reciente, lo importante es realizar muestreos serológicos (*página 153*).

Los muestreos serológicos están basados en la detección de anticuerpos específicos contra el virus. La importancia de realizar muestreos es con la finalidad de conocer cuales son las infecciones que se han presentado en la explotación pecuaria, y estar prevenido para tomar las medidas de manejo más adecuadas en el momento que ocurra un brote.

También es importante realizar muestreos serológicos después que se haya presentado la infección, con la finalidad de conocer como fue la evolución de la enfermedad. La

información que se genere puede indicar si es que el brote ha desaparecido, o que la infección persiste en la granja en forma subclínica (*véase la página 157 del capítulo siguiente*).

Para correlacionar los resultados de la virología diagnóstica con las alteraciones patológicas en el tejido, es necesaria la identificación del virus específico y asociar el agente con el proceso clínico. La selección de tejido o material, junto con la correlación de los signos clínicos, es importante al buscar un diagnóstico específico. Por ejemplo: si se aísla un virus del cerebro de un animal que muestra signos de encefalitis, se puede concluir que aquel es el factor etiológico, pues los virus en estado latente en el sistema nervioso central son sumamente raros. En cambio, el aislamiento de un virus de la faringe de un animal con enfermedad respiratoria sólo tiene importancia si se le aísla de otros tejidos (pulmón, sangre, bazo, etc.)

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Es importante que los médicos veterinarios conozcan el tipo de muestras requeridas por el laboratorio para cada enfermedad en particular y el tipo de preservador utilizado para que llegue en buenas condiciones al laboratorio (*véase el cuadro en la página 148*). Para evitar errores, la muestra debe ir bien identificada. En caso de duda es conveniente comunicarse con el personal del laboratorio donde la muestra va a ser enviada.

Muestras de cadáver

La necropsia se realiza con la técnica usual (*véase el capítulo correspondiente en la página 11*). Debe recordarse que el mejor tiempo para la recolección de muestras es inmediatamente después de la muerte, ya que después puede haber contaminación. Para el cultivo viral las mejores muestras se obtienen inmediatamente de abierto el cuerpo, pues ello minimiza la contaminación. De preferencia las muestras para cultivo viral deben obtenerse antes de transcurridos 20 a 30 minutos de la

muerte, pues de lo contrario los cambios de pH en los tejidos inactivan la mayor parte de los virus. Sin embargo, existen algunas excepciones como el ectima contagioso y la rabia (*página 160*), en las cuales los virus permanecen estables por más tiempo.

Las muestras de tejidos para pruebas de anticuerpos fluorescentes deben obtenerse con tijeras y pinzas limpias. Lo más conveniente es que los trozos de tejidos tengan aproximadamente 0.5 cm cuadrados. Estas muestras deben conservarse frías durante el transporte al laboratorio. Si el tiempo de transporte es mayor a 24 horas, el tejido debe ser congelado. Los líquidos conservadores sirven para remitir muestras en las que se ha de examinar virus. De ordinario se emplea la solución al 50 % de glicerol en solución amortiguada salina. Se prefieren los amortiguadores con fosfatos, con un pH final entre 7.2 y 7.5 (*véase la página 45*). La cantidad de líquido no debe ser menor de 10 veces el volumen del tejido. En todos los casos debe de cuidarse que los recipientes utilizados para el transporte para examen virológico estén estériles.

Muestras de líquidos

En el caso de las muestras de suero para detección de anticuerpos, puede tomarse sangre durante las primeras cuatro o cinco horas después de la muerte. La hemólisis presente en muestras autolisadas puede interferir con la mayoría de las pruebas serológicas.

El mejor sitio para obtener suero de un animal que ha estado muerto por varias horas, es la aurícula del corazón o la vena cava posterior.

Los líquidos corporales y cefalorraquídeo son estables durante 4 o 5 horas. después de la muerte, si el animal ha sido refrigerado. Estos líquidos pueden obtenerse por medio de una aguja y jeringa estéril y colocarse en un tubo de ensayo que contenga *EDTA* (ácido etileno-diaminotetraacético) Los líquidos de las articulaciones por lo general se enfrían

rápidamente a consecuencia de su ubicación periférica, por lo que son estables por 4 horas después de la muerte.

Muestras de articulaciones

Las articulaciones deben abrirse en forma cuidadosa, debido a la facilidad que tienen para contaminarse. Un método para la obtención de muestras de articulaciones consiste en:

- Lavar la piel con alcohol.
- Practicar una incisión utilizando un bisturí estéril.
- Empleando otro bisturí estéril, se efectúa un corte a través de la cápsula de la articulación, abriéndola lo máximo posible.
- Sin tocar la cápsula, se introduce un hisopo, obteniendo la muestra del extremo opuesto de la articulación.

PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras deben ser enfriadas y enviadas inmediatamente al laboratorio. Si no pueden enviarse al laboratorio dentro de los 30 minutos de extraídas, los tejidos deben ser congelados. Debido a que casi todos los virus son inestables o no se conservan viables en el congelador de un refrigerador casero, estas muestras deben ser acondicionadas con hielo seco y enviadas lo antes posible al laboratorio. Para el aislamiento viral es esencial el empleo de medios para transporte. Estos medios deben ser almacenados a -20°C . Antes de su empleo los frascos deben ser lentamente descongelados y utilizados antes de las 12 horas. El medio de transporte no debe ser almacenado sin congelar y nunca debe usarse un medio que ha estado descongelado durante más de 24 horas. Se recomienda que una vez descongelados los medios para transporte no se deben volver a congelar.

El medio generalmente es suministrado por el laboratorio. Aunque su composición puede variar levemente, básicamente consiste en un líquido compuesto de solución de Hanks, más una proteína como albúmina al 1 %, una

solución amortiguada y antibióticos incluyendo penicilina, estreptomina y polimixina B. La relación muestra : medio debe ser alrededor de 1:10. Si no se dispone de este medio es posible utilizar leche descremada estéril como sustituto. Las muestras de materia fecal fresca pueden utilizarse para la identificación de virus entéricos sin necesidad de medios de transporte, por ejemplo en rotavirus. En el caso de hisopos, estos deben ser colocados en medio de transporte aeróbico y anaeróbico.

ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO

En términos generales, las muestras a enviar a un laboratorio deben ser colocadas en un recipiente hermético de vidrio o plástico. El recipiente debe estar correctamente empaquetado para evitar que se rompa durante el transporte, por ejemplo: con aserrín, algodón o papel. En los casos en donde la refrigeración sea recomendable, ésta se puede realizar de varias maneras:

- por un lado es posible colocar hielo en un recipiente hermético, y el frasco de la muestra colocado dentro del mismo. Dependiendo de la temperatura externa éste método mantendrá la muestra fría durante 8 a 24 horas.
- Si el médico veterinario puede llevar las muestras al laboratorio, el método ideal de refrigeración es un frasco al vacío (*thermos*) conteniendo hielo, pero tales frascos están sujetos a roturas si se envían por correo a menos que estén muy bien empaquetados.
- Un método de refrigeración más prolongado consiste en el empleo de **hielo seco** (bióxido de carbono sólido). En este caso se coloca el recipiente que contiene la muestra en una bolsa de plástico, la que se rodea con hielo seco envuelto en papel. **Nunca se debe colocar el hielo seco en un recipiente hermético, pues la volatilización del CO_2 durante el transporte puede causar una explosión.** El recipiente ideal cuando se utiliza hielo seco es una caja de cartón.

Independientemente del tipo de muestra enviada al laboratorio y de la determinación requerida, existen algunos criterios importantes que deben tomarse en cuenta:

- Las muestras deben de ser lo más frescas posible y obtenidas y preservadas correctamente.
- Cada muestra debe ser de fácil identificación y rotulada.
- Junto con la muestra, el profesional debe incluir la siguiente información:

- ◊ Nombre y domicilio del propietario.
- ◊ Signos clínicos que el paciente manifiesta
- ◊ Número de animales en riesgo y detalles de cualquier hallazgo *postmortem* (página 15).
- ◊ Siempre que sea posible, diagnósticos presuntivos.
- ◊ El tipo de muestra enviada
- El médico veterinario debe indicar con claridad la determinación exacta que requiere y acompañar su nombre, domicilio y número telefónico.

Cuadro 20. Toma y envío de muestras para diagnóstico de enfermedades virales

<i>Enfermedad</i>	<i>Identificación del virus y lesiones</i>	<i>Muestra (conservador)</i>	<i>Prueba Serológica</i>	<i>Muestra (conservador)</i>
Anemia Infecciosa Equina	Aislamiento	Sangre completa, bazo (4 °C)	ELISA, Inmunodifusión.	Suero 5 ml (- 4 °C)
Artritis encefalitis caprina	Necropsia Aislamiento Histopatología	Líquido Sinovial (- 4 °C) Cerebro, articulación, glándula mamaria, pulmón (formalina al 10%)	Inmunodifusión Seroneutralización	Suero 5ml (- 4 °C)
Artritis viral aviar	Aislamiento	Líquido Sinovial, bazo, tráquea (- 4° C)	Inmunodifusión Seroneutralización	Suero 5ml (- 4 °C)
Aujeszky (Pseudorabia)	Aislamiento, Inoculación en ratón o conejo *, Examen Histológico	Cerebro, médula espinal (- 4° C), pulmón, hígado y bazo fetales. Encéfalo, tonsila faríngea (formalina al 10%)	ELISA, Hemaglutinación indirecta, Seroneutralización, Inmunodifusión.	Suero 5 ml (- 4 °C)
Bronquitis infecciosa aviar	Aislamiento Histológico	Traquea, pulmón (- 4° C) Traquea, pulmón, riñón (formalina al 10%)	Seroneutralización, ELISA, Inmunodifusión	Suero 5ml (- 4 °C)

<i>Enfermedad</i>	<i>Identificación del virus y lesiones</i>	<i>Muestra (conservador)</i>	<i>Prueba Serológica</i>	<i>Muestra (conservador)</i>
Diarrea viral bovina (BVD)	Aislamiento viral	Hisopo nasal, conjuntival y fecal, fetos (- 4 °C)	Seroneutralización <i>ELISA</i>	Suero 5ml (- 4 °C)
Ectima contagioso	Microscopía electrónica Histopatología	Costras o líquidos vesiculares (- 4 °C) ó glicerina al 50% Biopsias o muestras de piel (formalina al 10%)	Fijación de complemento, Inmunofluorescencia	Suero 5ml (- 4 °C)
Encefalitis equina de Venezuela, del Este y del Oeste (EEV, EEE, EEO).	Aislamiento viral, Inoculación en ratón lactante *	Sueros (estado agudo), cerebro, hígado, bazo, riñón, pulmón, nódulo linfático (- 4 °C)	Inhibición de la hemaglutinación, Fijación de complemento y Seroneutralización	Suero 5ml (- 4 °C)
Encefalomielitis aviar	Aislamiento	Encéfalo (- 4 °C)	Seroneutralización Inmunodifusión	Suero 5ml (- °C)
Encefalopatía espongiiforme bovina y en otras especies (no es viral)	Histopatología e inmunohistoquímica	Encéfalo, médula oblonga (formalina al 10%)		
Enfermedad de Gumboro.	Histopatología	Bolsa de Fabricio, hígado, bazo (formalina al 10%)	Seroneutralización Precipitación en gel <i>ELISA</i>	Suero 5 ml (- 4 °C)
Enfermedad de Marek	Histopatología	Nervio ciático, hígado, bazo, (formalina al 10%)	Seroneutralización	Suero 5 ml (- 4 °C)
Enfermedad de Newcastle.	Histopatología Aislamiento	Traquea, encéfalo, bazo (formalina al 10%) Heces, traquea, encéfalo, bazo (- 4 °C)	Inhibición de la hemaglutinación. Seroneutralización <i>ELISA</i>	Suero 5 ml (- 4 °C)
Enfermedad Hemorrágica de los conejos	Necropsia	Animal completo (- 4 °C)	Inhibición de la hemaglutinación	Suero 5 ml (- 4 °C)
Enfermedad del Ojo Azul en cerdos	Aislamiento	Encéfalo, bazo (- 4 °C)	Inhibición de la hemaglutinación Seroneutralización	Suero 5 ml (- 4 °C)
Enterovirus Porcino	Aislamiento	Heces, encéfalo, pulmón, fetos (- 4 °C)	Seroneutralización	Suero 5ml (- 4 °C)

<i>Enfermedad</i>	<i>Identificación del virus y lesiones</i>	<i>Muestra (conservador)</i>	<i>Prueba Serológica</i>	<i>Muestra (conservador)</i>
Fiebre catarral maligna	Necropsia Histopatología Aislamiento	Cadáver (4 °C) Encéfalo, riñón, lengua, hígado (formalina al 10%) Leucocitos (- 4 °C)	Seroneutralización, Anticuerpos Fluorescentes Indirecta	Suero 5ml (- 4 °C)
Fiebre porcina clásica (“cólera porcino”)	Detección por anticuerpos fluorescentes en cortes por congelación Histopatología, Inmunohistoquímica	Tonsilas, nódulo linfático Cerebro, bazo, tonsila	Seroneutralización, Hemaglutinación Indirecta.	Suero 5 ml (- 4 °C)
Gastroenteritis transmisible porcina (GET).	Inmunofluorescencia Aislamiento del virus Necropsia Examen histológico	Intestino delgado (Ileon) (- 4 °C) Yeyuno e Ileon (- 4 °C) Animal Vivo Yeyuno e Ileon (- 4 °C)	Seroneutralización, Hemaglutinación Indirecta <i>ELISA</i>	Suero 5 ml (- 4 °C)
Hepatitis aviar con cuerpos de inclusión	Histopatología	Hígado (Formalina al 10%).	Inhibición de la hemaglutinación.	Suero 5ml (- 4°C)
Influenza Aviar	Aislamiento	Traquea, pulmón, páncreas, intestino.	Inhibición de la hemaglutinación, Inmunodifusión	Suero 5ml (- 4 °C)
Influenza porcina	Aislamiento	Traquea pulmón (- 4 °C)	Inhibición de la hemaglutinación Seroneutralización, Inmunodifusión	Suero 5ml (- 4 °C)
Laringotraqueitis aviar	Histopatología Aislamiento	Traquea, pulmón (formalina al 10%) Traquea, pulmón	Seroneutralización	Suero 5ml (- 4 °C)
Leucosis bovina			<i>ELISA</i> Inmunodifusión Seroneutralización	Suero 5ml (- 4 °C)
Mixomatosis en conejos	Aislamiento Histopatología Necropsia	Nódulos (4 °C) Nódulos (formalina 10%) Animal Completo (4 °C)	Fijación de complemento. Inmunodifusión Seroneutralización	Suero 5ml (- 4 °C)
Neumonía progresiva ovina (<i>Maedi, Visna</i>)	Necropsia, Aislamiento Histopatología	Cadáver (- 4 °C) Pulmón, glándula mamaria	Inmunodifusión Seroneutralización	Suero 5ml (- 4 °C)
Papilomatosis bovina	Histopatología	Papilomas (formalina al 10%)	Inhibición de la hemaglutinación	

<i>Enfermedad</i>	<i>Identificación del virus y lesiones</i>	<i>Muestra (conservador)</i>	<i>Prueba Serológica</i>	<i>Muestra (conservador)</i>
Parainfluenza 3 (PI3)	Aislamiento	Traquea, pulmón (- 4 °C)	Seroneutralización	Suero 5 ml (- 4°C)
Parvovirus canino	Aislamiento del virus Hemadsorción Necropsia Histopatología	Contenido Intestinal (4 °C) Contenido Intestinal (4 °C) Cadáver (4 °C) Intestino, Nódulo Linfático, bazo, corazón, hígado (Formalina al 10%)		
Parvovirus porcino	Aislamiento	Fetos, mortinatos, heces (- 4 °C)	Inhibición de la hemaglutinación, Inmunodifusión Seroneutralización.	Suero 5 ml (- 4 °C)
Peste porcina africana	Anticuerpos fluorescentes en cortes congelados. Aislamiento del virus por hemadsorción. Histopatología	Tonsilas, nódulo linfático, bazo (- 4 °C). Tonsilas, Bazo, nódulo linfático, bazo (- 4 °C). Encéfalo, nódulos linfáticos, bazo, (formalina al 10%)	Fijación de complemento Inmunodifusión	Suero 5ml (- 4 °C)
Rabia	Anticuerpos fluorescentes. (véase la página 160) Histopatología	Cerebro, cerebelo, glándulas salivales (Glicerina al 50% a 4 °C ó - 4 °C). Cerebro (formalina al 10%)	(véase la página 160)	
Rinoneumonitis viral equina.	Necropsia Histopatología	Animal entero (- 4 °C) Encéfalo riñón, hígado (formalina al 10%), adrenal fetal (fijador de Bouin)		
Rinotraqueitis viral bovina (IBR)	Aislamiento	Traquea, esófago (- 4 °C)	ELISA Seroneutralización Hemaglutinación Indirecta	Suero 5ml (- 4 °C)
Scrapie (no es viral)	Necropsia, Inmuno-histoquímica	Cadáver (4 °C), Cerebro (formalina al 10%)		
Síndrome de baja postura			Inhibición de la hemaglutinación	Suero 5ml (- 4 °C)

<i>Enfermedad</i>	<i>Identificación del virus y lesiones</i>	<i>Muestra (conservador)</i>	<i>Prueba Serológica</i>	<i>Muestra (conservador)</i>
SISRS - PRRS (Síndrome disgénico y respiratorio del cerdo)	Aislamiento	Pulmón (- 4 °C)	Seroneutralización Inmunofluorescencia indirecta	Suero 5ml (- 4 °C)
Viruela aviar	Aislamiento	Costras (4°C)	Seroneutralización	Suero 5ml (- 4 °C)
Virus sincicial respiratorio (RSV)	Aislamiento	Tráquea, pulmón (- 4 °C)	ELISA Seroneutralización Hemaglutinación indirecta	Suero 5ml (- 4 °C)

OBSERVACIONES

* La inoculación de animales de laboratorio para realizar prueba biológica no está permitida por las leyes para la prevención de crueldad hacia los animales en algunos países.

Algunas de las enfermedades mencionadas en este capítulo están en etapa de control o erradicación en los diferentes países de Latinoamérica, por lo que la producción e importación de antígenos está regulada por las autoridades de Sanidad Animal correspondientes. De igual forma, debe consultarse la legislación local para la comunicación de los casos sospechosos de enfermedades de notificación obligatoria.

LECTURAS RECOMENDADAS

Anónimo: *Serologic Microtitration Techniques*. National Veterinary Services Laboratories. U.S. Department of Agriculture. Ames, Iowa, U.S.A. 1981.

Anónimo: *Technical manual for diagnosis of animal disease*. Japan International Cooperation Agency. Japan, 1983.

Beard, C.W.: *Serologic procedures in isolation and identification of avian pathogens*, edited by Hitcher, H.G. & Williams, J.E. pp 129-135.

American Association of Avian Pathologist. U. S. A., 1980.

Burlenson, F.G, Chambers T.M, Wiedbrauk D. L.: *Virology A Laboratory Manual*. Academic Press Inc. 1992.

Cottral, G.E.: *Manual of standard methods for veterinary microbiology*. Cornell University press. Ithaca, U. S. A., 1978.

Harlow E., Lane D.: *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Lucio, M.B, Rosales, G.C. y García, Z.J.I.: Pruebas serológicas en medicina aviar, en: Morilla G, A. y Bautista G, C.R. (editores): *Manual de inmunología*. Diana. México, 1986.

Wayne, R.A, Carter, G.R.: *Essentials of Veterinary Virology*. Michigan State University Press. U.S.A., 1981.

Diagnóstico de enfermedades virales

*Humberto Ramírez Mendoza
Germán Valero Elizondo
Moisés Fraire Cachón
Dante González Salazar*

Introducción

Prueba de seroneutralización

Inhibición del efecto citopático

Seroneutralización en ratones

Reducción de la formación de placas

Inhibición de focos fluorescentes

Inhibición de la hemadsorción

Prueba de microseroneutralización en cultivo celular contra el virus de la enfermedad de la bolsa de Fabricio (método beta)

Interpretación de resultados

Cuerpos de inclusión

Observaciones

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades virales pueden diagnosticarse por aislamiento y observación de los virus (véase “*microscopía electrónica*” en la página 104), sus antígenos (véase “*inmuno-histoquímica*” en la página 87) y ácidos nucleicos (véase “*biología molecular*” en la página 92), o la respuesta del organismo contra ellos, evidenciada por la producción de anticuerpos y lesiones (véase el capítulo anterior en la página 145).

Los anticuerpos son parte de la respuesta del hospedador cuando reacciona

frente a una infección, en forma natural o inducida artificialmente. Los anticuerpos neutralizantes son los responsables del efecto protector del suero inmune y están dirigidos contra determinantes antigénicos de la superficie del virión; además, son específicos de cepa y tipo. Estos determinantes antigénicos son los que intervienen en el proceso de adsorción del virus a la célula; por esto, la seroneutralización es la técnica más sensible y específica para la caracterización viral por métodos serológicos.

PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN

La neutralización viral se define como la pérdida de la capacidad infectante del virus por la reacción del mismo con un anticuerpo específico.

El procedimiento básico consiste en mezclar diluciones apropiadas del suero y virus, incubarlas en ciertas condiciones e introducir la mezcla en un sistema susceptible de ser infectado, en donde el virus no neutralizado pueda producir un efecto reconocible, por ejemplo: muerte, lesiones específicas (p.ej: rabia), hemaglutinación, efecto citopático, etc. Estos sistemas susceptibles pueden ser animales de experimentación (véase la nota en la página 166) tales como ratón, rata y cobayo, huevos embrionados de pollo o pato y cultivos celulares de líneas establecidas o cultivos primarios.

El tiempo y la temperatura de incubación, el pH, la presencia o ausencia de complemento, etc., son factores que intervienen en la neutralización. Si por ejemplo, la mezcla del virus con el suero hiperinmune se incuba por corto tiempo a baja temperatura, se puede recuperar el virus infeccioso diluyendo la preparación, mientras que si se deja más tiempo o se aumenta la temperatura, la neutralización es irreversible.

La prueba de neutralización se puede utilizar para:

- Identificación de aislamientos utilizando sueros específicos de referencia.
- Diagnóstico de infección viral demostrando aumento de títulos de anticuerpos específicos en el curso de una enfermedad.
- Determinar niveles de protección de poblaciones; ya que en general, los anticuerpos neutralizantes persisten durante tiempos prolongados.

Para la implementación de la prueba de seroneutralización se emplean dos métodos principalmente:

- Suero variable, virus fijo:** donde una cantidad conocida de virus, que previamente se tituló, se mezcla con diluciones variables de un suero problema y se inocula en un sistema huésped susceptible. El título seroneutralizante corresponderá a la dilución más alta que protege de la infección.
- Suero constante, virus variable:** donde diferentes concentraciones de virus se enfrentan a una concentración sérica uniforme. Los resultados se expresan como índice seroneutralizante, y representan la diferencia entre el título del virus en presencia del suero control negativo y el título del virus en presencia del suero problema.

En ambos métodos debe definirse el punto final de neutralización o infectividad, que consiste en la dilución más alta de suero que protege, o la dilución más baja de virus que infecta, una unidad del sistema susceptible. Los puntos finales 100% no son convenientes, debido a que se encuentran en los extremos y no permiten detectar diferencias menores de un orden de magnitud. El tipo de

punto final deseable para la estimación es el basado en la obtención de una respuesta en la mitad de las unidades de prueba, o sea el punto final 50%. La precisión en la estimación del valor 50% dependerá del número de unidades de prueba neutralizadas por dilución. El método de Reed y Muench es el más empleado, y se expresará de acuerdo al sistema indicador utilizado como infectividad (DI50), muerte (DL50), parálisis (DP50), infectividad de cultivo de tejidos (DICT50), etc.

INHIBICIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO

Esta prueba sólo es aplicable en aquellos virus que son capaces de producir lesión celular visible al microscopio invertido.

No todos los virus causan efecto citopático. Los virus comunes capaces de generar efecto citopático en aves, cerdos y bovinos se enlistan en el cuadro 21.

Cuadro 21. VIRUS QUE PRODUCEN EFECTO CITOPÁTICO

virus de aves
<ul style="list-style-type: none"> • Artritis viral • Bronquitis infecciosa • Gumboro • Laringotraqueitis • Marek • Newcastle • Viruela
virus de cerdos
<ul style="list-style-type: none"> • Aujeszky • Adenovirus • Síndrome Disgenésico y Respiratorio del Cerdo (<i>PRRS</i>) • Enfermedad del ojo azul (paramixovirus porcino) • Enterovirus (todos los serotipos) • Gastroenteritis transmisible

virus de bovinos

- Diarrea viral bovina
- Estomatitis vesicular
- Rinotraqueitis infecciosa bovina
- Parvovirus bovino
- Parainfluenza 3
- Virus sincicial respiratorio

En el caso de las aves no se utiliza la prueba de seroneutralización en monoestratos celulares con mucha frecuencia debido a que los virus en su mayoría están adaptados al embrión de pollo, siendo las enfermedades de Gumboro y artritis viral los virus que no requieren adaptación al cultivo celular después de haber estado en embrión de pollo.

SERONEUTRALIZACIÓN EN RATONES

Esta prueba se utilizaba frecuentemente para la medición de anticuerpos contra la rabia, a fin de evaluar la protección conferida por vacunas, tanto para uso humano como para animales (*véanse las páginas 169 y 167 del capítulo de diagnóstico de rabia*). Actualmente se prefiere inocular cultivos celulares susceptibles (neuroblastoma) en vez de animales de laboratorio (*véase la nota en la página 166*).

Las diluciones del suero se incuban con antígeno rábico por una hora y media. Posteriormente se inoculan de seis a diez ratones lactantes por vía intracerebral y se evalúa la mortalidad durante 21 días. A menor mortalidad, mayor será el título de anticuerpos.

REDUCCIÓN DE LA FORMACIÓN DE PLACAS

No todos los virus que causan efecto citopático forman placas. Las placas son lesiones del monoestrato celular que al teñirse

con rojo neutro o cristal violeta⁸¹ pueden observarse a simple vista o con una lupa.

El método consiste en dejar incubando diferentes diluciones del suero y cantidades constantes de virus. Se incuban por una hora y se agregan a cajas de Petri o botellas de leche en las cuales previamente se ha formado un monoestrato celular. Después de 42 a 72 horas se pueden observar las placas en aquellas diluciones en donde el suero no fue capaz de neutralizar el virus. Como ejemplo de aplicaciones de esta prueba están el virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo, la enfermedad de Marek, el Newcastle aviar y la fiebre aftosa⁸².

INHIBICIÓN DE FOCOS FLUORESCENTES

Esta prueba se utiliza en aquellos virus que no causan efecto citopático y que tampoco aglutinan glóbulos rojos; como ejemplos de estos virus se encuentran el de la fiebre porcina clásica ("cólera porcino"), algunas cepas de diarrea viral bovina y rabia.

La prueba consiste en realizar diluciones del suero problema, las que se incuban por 60 a 90 minutos con el virus conocido. Esta mezcla se añade a un monoestrato celular y 24 horas después se fija el monoestrato con acetona, para después agregar el conjugado de anticuerpos específicos contra el virus marcados con isotiocianato de fluoresceína (*véase la técnica de anticuerpos fluorescentes para el diagnóstico de rabia en la página 163*). Cuando el suero neutraliza al virus, se previene la fluorescencia, al no haber multiplicación del antígeno viral al cual se adhiera el conjugado.

⁸¹ C.I. 42555, violeta de genciana, violeta básica 3.

⁸² La fiebre aftosa es exótica en México y no puede emplearse dicho virus en laboratorios de este país.

INHIBICIÓN DE LA HEMADSORCIÓN

Existen virus como: parvovirus, orthomixovirus, paramixovirus y adenovirus que, al multiplicarse en los cultivos celulares, no producen efecto citopático, pero si causan la expresión de receptores celulares para eritrocitos, capaces de aglutinar glóbulos rojos. En este caso la neutralización del virus se observa con la ausencia de adherencia de glóbulos rojos sobre el monoestrato.

El procedimiento es muy similar a las pruebas anteriores.

- Se hacen diluciones del suero, cada una de estas se pone a incubar por una hora con una cantidad constante de virus.
- Esta mezcla se coloca en un monoestrato celular.
- Después de 48 a 72 horas se agregan glóbulos rojos a los monoestratos con las diferentes diluciones.
- Una hora después se lavan los monoestratos.
- En las diluciones bajas se observará que no se adhirieron glóbulos rojos al monoestrato, debido a que el virus fue neutralizado por el suero.

PRUEBA DE MICROSERONEUTRALIZACIÓN EN CULTIVO CELULAR CONTRA EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE LA BOLSA DE FABRICIO (MÉTODO BETA)

El método que se describe a continuación utiliza diluciones dobles seriadas del suero y una cantidad constante del virus (100 dosis infectantes 50% en 0.05 ml). Se prueban ocho sueros por cada placa de 96 pozos.

- 1) Se colocan 0.05 ml de virus en todos los pozos de la microplaca de fondo plano para cultivo celular con excepción de la fila 12, que será el control de células.

- 2) Se colocan 0.05 ml de solución salina amortiguada de fosfatos (SSAF, *PBS*, página 45) en todos los pozos de la fila 12.
- 3) Se añaden 0.05 ml de una muestra de suero en cada pozo de la fila uno, de las hileras A hasta la H. Esto se realiza con un microdilutor de 0.05 ml que permite mezclar la muestra con la SSAF. Inmediatamente después de hacer la primera dilución se transfieren 0.05 ml con el mismo microdilutor al pozo de la fila dos y así sucesivamente hasta la fila 11. De esta forma se tienen diluciones desde 1:2 hasta 1:2048.
- 4) Se incuban las placas de 30 a 45 minutos a 37 °C.
- 5) Se añaden 0.2 ml de fibroblastos de embrión de pollo (1×10^6 / ml) en medio de cultivo celular con 10% de suero fetal bovino a todas las celdillas de la microplaca.
- 6) Se tapa la microplaca y se incuba por 72 horas antes de leer la prueba.

El título del suero se considera a la más alta dilución capaz de neutralizar la actividad viral detectable por la presencia de efecto citopático. Al realizar la prueba deberán incluirse sueros controles positivo y negativo, así como un control de células y de virus que permitan conocer el desempeño de la prueba. Las placas se leen en un microscopio invertido, buscando la presencia de efecto citopático; o bien, se fijan con etanol las monocapas después de descartar el medio y se tiñen con una solución de cristal violeta⁸³ al 1%. En las diluciones donde el virus ejerció su efecto se observará un color azul pálido, en comparación con el color azul fuerte donde la actividad viral fue neutra-

⁸³ C.I. 42555, violeta de genciana, violeta básica 3.

lizada por el suero. El pozo control de células debe mostrar un color azul fuerte.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La interpretación de los resultados obtenidos en una prueba depende de muchos factores como la historia clínica, la interacción viral, el tipo de prueba empleada, la edad, sexo, raza y función zootécnica, localización geográfica de la granja, grado de avance de los programas oficiales de control o erradicación, etc. Debido a esta combinación de factores, no existe una equivalencia simple universal entre los títulos encontrados en la prueba y el estado sanitario de los animales.

En algunas enfermedades como la **parvovirus porcina**, cuando los títulos serológicos en cerdas reproductoras son negativos o muy bajos, es motivo de preocupación, pues indican susceptibilidad a infección. En esta enfermedad es preferible que los animales se infecten, se enfermen y seroconviertan antes de alcanzar la madurez reproductiva, porque la infección de hembras gestantes ocasiona mortinatos. Una situación similar se presenta en mujeres con **rubéola** y en la **toxoplasmosis** de ovejas y mujeres.

En la enfermedad de **Aujeszky**, la serología positiva implica importantes problemas médicos y sanitarios, pues es una enfermedad difícil de erradicar y de notificación obligatoria en México y otros países. Existen cepas vacunales contra Aujeszky producidas por ingeniería genética, que carecen de algún antígeno determinado, lo que permite identificar si los anticuerpos encontrados son vacunales o consecuencia de una infección. La disponibilidad de estas vacunas y los antígenos diagnósticos está normada por las autoridades sanitarias de cada país. Además, en esta enfermedad, los animales que han sido vacunados pueden tener resultados serológicos negativos, y sin embargo, estar protegidos en un desafío con

virus patógeno, debido a que la respuesta inmune importante es de tipo celular.

Los animales vacunados contra **parainfluenza 3** pueden tener resultados serológicos negativos aún cuando tengan una fuerte inmunidad local en vías aéreas.

Los títulos serológicos no necesariamente coinciden en diferentes pruebas para la misma enfermedad. En los casos de la **gastroenteritis transmisible del cerdo** y el **virus sincicial respiratorio** en bovinos, los títulos son consistentemente mayores en la hemaglutinación indirecta.

Se pueden encontrar casos positivos en seroneutralización y negativos en inmunodifusión, debido a que la seroneutralización es más sensible, mientras que la inmunodifusión es altamente específica.

En las enfermedades que presentan heterogeneidad antigénica, como en la **artritis viral de las aves**, la presencia de títulos altos de anticuerpos no necesariamente garantiza que los animales están protegidos contra una infección por virus de campo.

Por lo antes expuesto, la mayoría de las publicaciones declinan comentar cuales son los valores de corte o títulos umbrales para determinar cuando un caso se toma como positivo o negativo. En algunos casos se han publicado rangos amplios de títulos de corte por diferentes investigadores.

Posiblemente el mejor criterio serológico de infección sea la **seroconversión** entre dos muestras tomadas a un mes de intervalo.

Con las premisas anteriores, en los cuadros siguientes se presentan, a manera de sugerencia, las interpretaciones de los títulos serológicos en algunas enfermedades de los animales domésticos.

Cuadro 22. INTERPRETACIÓN DE TÍTULOS SEROLÓGICOS A TRAVÉS DE SERONEUTRALIZACIÓN EN AVES

<i>Enfermedad</i>	<i>Título</i>	<i>Interpretación</i>
Bronquitis infecciosa	10 a 40	negativo
	80	positivo
	2560 a 5120	brote
Gumboro	10 a 40	negativo
	80	positivo
Síndrome de la baja postura	10 a 40	negativo
	80	positivo

Cuadro 23. INTERPRETACIÓN DE TÍTULOS SEROLÓGICOS EN CERDOS

<i>Enfermedad</i>	<i>Título</i>	<i>Interpretación</i>
Aujeszky	2	positivo
Ojo azul	8	negativo
	16	sospechoso
	32	positivo

Cuadro 24. INTERPRETACIÓN DE TÍTULOS SEROLÓGICOS EN BOVINOS

<i>Enfermedad</i>	<i>Título</i>	<i>Interpretación</i>
Parainfluenza 3 (PI3)	5	negativo
	10	positivo
Rinotraqueitis infecciosa (IBR)	5	negativo
	10	positivo
Reovirus	5	negativo
	10	positivo
Virus sincicial respiratorio (RSV)	5	negativo
	10	positivo

CUERPOS DE INCLUSIÓN

En algunas enfermedades virales es posible observar cuerpos de inclusión característicos en el examen histopatológico. Los cuerpos de inclusión corresponden a matrices cristalinas de proteínas y ácidos nucleicos virales y son más fácilmente observables cuando los tejidos fueron fijados con Bouin (véase la página 47), Susa (véase la página 48), u otro fijador fuerte.

A continuación se enlistan algunos virus productores de cuerpos de inclusión citoplásmicos:

- Estomatitis papular bovina (parapox): epitelio bucal.
- Moquillo canino (paramixovirus): epitelios respiratorio, urinario, biliar, de epidídimo y útero; mucosa corneal.
- Parainfluenza 3 (paramixovirus): bronquios y bronquiolos.
- Rabia (Lyssavirus, "rhabdovirus"): cuerpos de Negri en neuronas piramidales grandes de hipocampo, neuronas de Purkinje y epitelio de córnea (véase la página 160).
- Viruela en todas las especies (poxvirus): cuerpos de Bollinger en epitelio respiratorio y piel.

A continuación se enlistan algunos virus productores de cuerpos de inclusión intranucleares:

- Adenovirus en todas las especies: bronquiolos.
- Aujeszky en cerdos (herpes): epitelio de glándulas en tonsilas faríngeas, hígado de fetos abortados
- Citomegalovirus (herpes) en todas las especies: bronquiolos.
- Hepatitis aviar por cuerpos de inclusión (adenovirus): hígado.
- Hepatitis infecciosa canina (adenovirus): hígado.
- Laringotraqueitis aviar (herpes): tráquea y bronquios.
- Moquillo canino (paramixovirus): encéfalo y córnea. (véase la página 161)
- Panleucopenia felina (parvovirus): criptas intestinales.
- Rinitis porcina por cuerpos de inclusión (citomegalovirus, herpes): epitelio nasal, de glándulas palatinas y renal.
- Rinoneumonitis viral equina (herpes): bronquiolos, hígado de fetos.
- Rinotraqueitis infecciosa bovina, vulvovaginitis y balanopostitis pustular bovina

(IBR, herpes): epitelios respiratorio, digestivo, reproductor; adrenal, hígado y pulmón de fetos.

- Rinotraqueitis viral felina (herpes): bronquiolos, hígado de fetos.

Debe recordarse que es posible encontrar otras estructuras dentro de las células que pueden confundirse con cuerpos de inclusión virales:

- ◇ Cuerpos de inclusión intranucleares geométricos normales (no patológicos) en hepatocitos y células epiteliales de los túbulos renales en perros.
- ◇ Cuerpos de inclusión intranucleares ácido-alcohol-resistentes en células epiteliales de túbulos renales en perros y otras especies con intoxicación por plomo.
- ◇ Cuerpos elementales de *Chlamydia*.
- ◇ Protozoarios intracelulares (*Toxoplasma*, *Babesia*, *Anaplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, *Trypanosoma*, *Eimeria*, *Isospora*, etc.).

OBSERVACIONES

La práctica sugerirá modificaciones a los procedimientos para adecuarlos a las necesidades y capacidades de cada laboratorio.

Algunas de las enfermedades mencionadas en este capítulo están en etapa de control o erradicación en los diferentes países de Latinoamérica, por lo que la producción e importación de antígenos está regulada por las autoridades de Sanidad Animal correspondientes. De igual forma, debe consultarse la legislación local para la comunicación de los casos sospechosos de enfermedades de notificación obligatoria.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Anónimo: *Serologic Microtitration Techniques*. National Veterinary Services Laboratories. U.S. Department of Agriculture. Ames, Iowa, U.S.A. 1981.
- Anónimo: *Technical manual for diagnosis of animal disease*. Japan International Cooperation Agency. Japan, 1983.

- Beard, C.W.: *Serologic procedures in isolation and identification of avian pathogens*, edited by Hitcher, H.G. & Williams, J.E. pp 129-135. American Association of Avian Pathologist. U. S. A., 1980.
- Burlenson, F.G, Chambers T.M, Wiedbrauk D. L.: *Virology A Laboratory Manual*. Academic Press Inc. 1992.
- Cottral, G.E.: *Manual of standard methods for veterinary microbiology*. Cornell University press. Ithaca, U. S. A., 1978.
- Freshney, R. I. *Culture of Animal Cells*. Wiley'Liss, Inc. New York, 1994.
- Harlow E., Lane D.: *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Lucio, M.B, Rosales, G.C. y García, Z.J.I.: Pruebas serológicas en medicina aviar, en: Morilla G, A. y Bautista G, C.R. (editores): *Manual de inmunología*. Diana. México, 1986.
- Wayne, R.A, Carter, G.R.: *Essentials of Veterinary Virology*. Michigan State University Press. U.S.A., 1981.

Diagnóstico de rabia

*Dante González Salazar
Juan I. Monroy Basilio
Germán Valero Elizondo*

Introducción

Histopatología de la rabia

Diagnóstico diferencial de la encefalitis rábica

Tinción de Seller

Tinción de Seller para improntas
Tinción de Seller para cortes

Tinción de Mann

Técnica de anticuerpos fluorescentes

Conjugado antirrábico

Inoculación en ratón (prueba biológica)

Diagnóstico de rabia en biopsias

Seroneutralización en ratón

Observaciones

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

La rabia es una enfermedad infecciosa, aguda, fatal, que afecta al sistema nervioso central de todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre. Es producida por un virus neurotrófico, de la familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus*. Existen diferentes mecanismos de transmisión, pero el más común es a través de una solución de continuidad causada por la mordedura de un animal que contiene el virus en su saliva. Los vectores más importantes para el hombre son el perro y el gato; para el bovino, es el murciélago hematófago a quien le produce la enfermedad conocida como rabia parálitica o “derriengue”. Esta enfermedad se manifiesta

por una gran variedad de signos neurológicos, por lo que clínicamente es difícil establecer un diagnóstico preciso.

El diagnóstico de rabia es una de las tareas de mayor responsabilidad para el médico veterinario, ya que de la veracidad y rapidez del dictamen, puede depender la vida de un ser humano. Actualmente existen varias técnicas rápidas y confiables, pero desafortunadamente en México, no todos los laboratorios de diagnóstico cuentan con el equipo, reactivos y personal capacitado para utilizar el procedimiento más apropiado. Sin embargo, independientemente de la técnica utilizada, el diagnóstico será favorecido cuando las muestras apropiadas llegan rápidamente al laboratorio, en buen estado de conservación y conteniendo una breve historia clínica.

HISTOPATOLOGÍA DE LA RABIA

En el estudio histológico de la rabia se observan lesiones típicas de una encefalomiелitis no supurativa, común en todas las infecciones virales del sistema nervioso: es decir, la reacción inflamatoria está constituida por infiltración perivascular de linfocitos (manguitos), gliosis focal o difusa (nódulos de Babes), hemorragia perivascular y diversos grados de degeneración neuronal, y los característicos corpúsculos de inclusión intracitoplásmicos, conocidos como cuerpos de Negri. Estas inclusiones se consideran patognomónicas de la rabia y se localizan principalmente en las neuronas, axones y dendritas del hipocampo (*Figura 3* y *Figura 4*); células piramidales de la corteza cerebral; en las células de Purkinje del cerebelo y en el ganglio del nervio trigémino (ganglio de Gasser).

Los cuerpos de Negri generalmente son redondos, pero pueden adoptar formas ovales, esferoideas, amiboideas, alargadas, etc. Reaccionan a las tinciones acidófilas tomando el color rosa a rosa púrpura, cuando se utiliza fucsina básica o eosina con azul de metileno como base. La característica más importante

de los cuerpos de Negri es su estructura interna en la que se basa el criterio indispensable para una identificación segura; dentro de la matriz acidófila aparecen gránulos basófilos, de color azul oscuro a negro, en número y distribución variable.

Es importante mencionar que para el diagnóstico histopatológico de la rabia, **LOS ANIMALES SOSPECHOSOS NO SE DEBEN SACRIFICAR**, ya que la duración del proceso clínico guarda relación directa con el tamaño, grado de desarrollo y abundancia de los cuerpos de Negri. Si las circunstancias lo requieren, el sacrificio se hará sin lesionar el cerebro y sin utilizar venenos que posteriormente pudieran causar dificultades al realizar la prueba de inoculación en ratón.

Un diagnóstico negativo a rabia, basado en la ausencia de cuerpos de Negri, no descarta la posible infección, ya que existen hasta un 30% de cepas rábicas que no producen inclusiones (cepas no negrigénicas); también se debe recordar que el virus fijo (CVS) no produce cuerpos de inclusión. En caso de que exista duda o no se encuentren los cuerpos de Negri, es recomendable enviar las muestras a un laboratorio donde realicen la prueba de inoculación en ratón y/o la de anticuerpos fluorescentes. Los tejidos se pueden enviar en frascos con tapón de rosca que contengan solución salina glicerinada al 50%, es decir, solución salina fisiológica (SSF) al 0.85% y glicerina químicamente pura a partes iguales, para que en caso de que exista el virus, este se conserve durante el transporte. Los frascos deben contener trozos de encéfalo que incluya hipocampo (**Figura 4**), corteza y cerebelo. Una vez recibidas en el laboratorio, las muestras se deben enjuagar repetidamente con SSF, hasta eliminar toda la glicerina, ya que esta puede interferir en las improntas para la tinción rápida de Seller y la de anticuerpos fluorescentes.

Para la observación histológica de los cuerpos de Negri se utilizan diferentes coloraciones específicas (además de H. E.), como las tinciones de Seller, Mann, Giemsa, etc. y con todas se obtienen buenos resultados. Sin embargo, es preciso distinguir a los cuerpos de Negri de los corpúsculos de inclusión producidos por otros virus y también de los artificios y los nucleolos normales de las células (véase la página 158 del capítulo de enfermedades virales).

aciones específicas (además de H. E.), como las tinciones de Seller, Mann, Giemsa, etc. y con todas se obtienen buenos resultados. Sin embargo, es preciso distinguir a los cuerpos de Negri de los corpúsculos de inclusión producidos por otros virus y también de los artificios y los nucleolos normales de las células (véase la página 158 del capítulo de enfermedades virales).

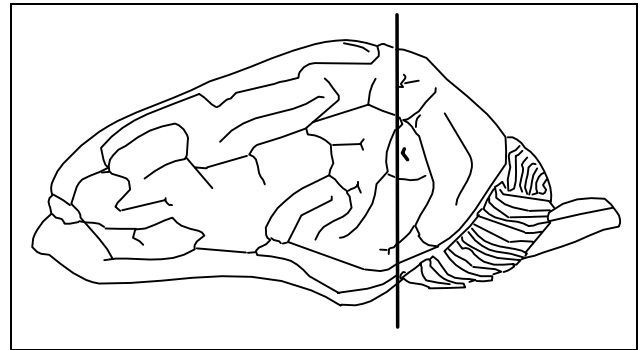


Figura 3 . Corte del cerebro de perro.

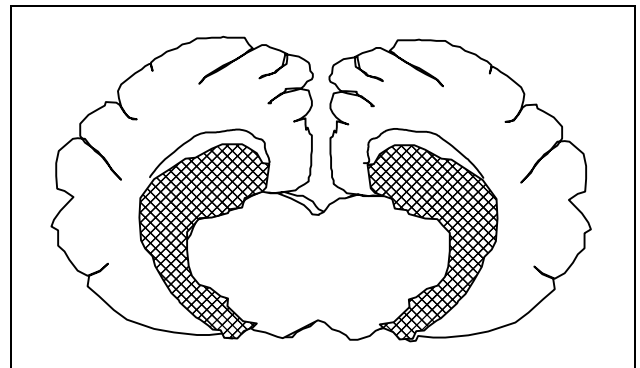


Figura 4 . Sitio de toma de la muestra (hipocampo).

Diagnóstico diferencial de la encefalitis rábica

Histológicamente la encefalitis rábica debe diferenciarse de algunas enfermedades tales como el moquillo canino, hepatitis infecciosa canina, listeriosis, polioencefalomalacia y encefalitis equina venezolana. En estos casos, para el diagnóstico diferencial hay que considerar:

- la historia clínica
- tipo y distribución de células inflamatorias presentes
- presencia, localización y características de

tinción de los corpúsculos de inclusión.

En el **moquillo canino**, los corpúsculos de inclusión se pueden observar en el citoplasma y núcleo de las células gliales del cerebelo, rara vez en las neuronas, no contienen gránulos internos basofílicos.

En la **hepatitis infecciosa canina**, los corpúsculos de inclusión son intranucleares, sin gránulos basofílicos, y se localizan en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, principalmente del cerebelo.

En la **listeriosis**, se observan microabscesos, predominando células polimorfonucleares, rodeados por microglía y vasculitis aguda con exudación de fibrina. Estas lesiones son más frecuentes en médula oblonga, bulbo y puente cerebral.

En la **polioencefalomalacia**, se observa necrosis laminar bilateral de corteza dorsal y occipital, edema intracelular en astrocitos, neuronas encogidas y eosinofílicas, hipertrofia capilar y macrófagos removiendo tejido necrótico.

En la **encefalomielitis equina venezolana**, se observan trombos en vasos sanguíneos y necrosis licuefactiva en área frontal de corteza; el infiltrado perivascular está formado por linfocitos y polimorfonucleares, principalmente afecta el cerebelo.

En países libres de *scrapie* ovino y **encefalopatía espongiiforme bovina** es conveniente hacer estos diagnósticos diferenciales por histopatología, microscopía electrónica o inmunohistoquímica en los casos enviados para diagnóstico de rabia ovina, bovina y en carnívoros, que hayan resultado negativos a inmunofluorescencia

TINCIÓN DE SELLER

Se requieren las siguientes soluciones:

Colorante de Seller, azul de metileno

azul de metileno⁸⁴, del 85 % 1 g
metanol absolutocbp 1000 ml

Colorante de Seller, fucsina básica

fucsina básica⁸⁵, del 92 %5 g
metanol absolutocbp 1000 ml

Se mezclan las soluciones sin filtrar y se deja en reposo durante 24 horas en frasco de tapón de rosca. Queda lista para usarse.

Tinción de Seller para improntas

La técnica de tinción rápida de Seller para impronta, es el primer método a utilizar para el diagnóstico de rabia, ya que es simple, rápido y económico, con la ventaja de que se puede implementar en cualquier laboratorio de diagnóstico. Está basado en la búsqueda de los cuerpos de Negri. Se requiere un microscopio, colorante de Seller y un técnico experimentado.

- a) Con tijeras se realizan cortes de hipocampo (**Figura 4**), corteza, médula oblonga y cerebelo. Se colocan sobre un abatelenguas con la superficie de corte hacia arriba. Con porta-objetos se realizan varias improntas de las diferentes regiones.
- b) La impronta aún húmeda se baña con el colorante de Seller de uno a cinco segundos, según el grosor del frotis, se enjuaga con agua corriente y se deja secar a temperatura ambiente (tinción y fijación simultánea).
- c) Las impresiones se protegen con bálsamo de Canadá (o DPX) y cubreobjetos.
- d) Primero se examinan las laminillas a poco aumento (10x) buscando las áreas más abundantes de neuronas y luego con aceite de inmersión (100x) para localizar los cuerpos de Negri.

Resultados de la tinción de Seller

A los 10 minutos de recibir un caso se puede dar un diagnóstico positivo a rabia. Los cuerpos de Negri adquieren formas variadas,

⁸⁴ C.I. 52015.

⁸⁵ C.I. 42500.

de color rojo púrpura con los gránulos internos de color azul oscuro. Las células nerviosas se tiñen de azul, el tejido intersticial de rosa y los eritrocitos de color anaranjado. Con esta técnica se pueden observar algunas inclusiones características fuera de las células, debido a que se trata de una impronta.

Para esta prueba se recomienda utilizar tejido fresco, ya que la autólisis altera el contraste cromático del tejido, haciendo más difícil la identificación.

Tinción de Seller para cortes

Para utilizar la tinción de Seller en cortes fijados e incluidos en parafina, se procede de la siguiente manera:

Cuando los cortes son desparafinados, se tiñen por inmersión en una mezcla de 6 ml de solución madre de fucsina básica (*véase arriba*), 20 ml de solución madre de azul de metileno (*véase arriba*) y 50 ml de metanol absoluto. El tiempo de tinción dependerá del grosor del corte, pero generalmente es entre 2 y 10 minutos. Las secciones teñidas se lavan con agua corriente, se secan con papel filtro y se montan en bálsamo de Canadá o DPX.

Resultados de la tinción de Seller

Los cuerpos de Negri se tiñen de un tono rojo violáceo oscuro y con gránulos internos de color azul oscuro, igual que los nucleolos. Las neuronas se tiñen azul violeta y los eritrocitos adoptan un tono rojo cobrizo

TINCIÓN DE MANN

Se fijan las muestras en líquido de Susa (*página 48*), fijador rápido de sublimado de mercurio (*página 47*) o Bouin (*página 47*). La tinción de Mann se prepara antes de usarse, de la siguiente manera:

azul de metilo ⁸⁶ en solución
acuosa al 1%..... 18 ml

⁸⁶ C.I. 4278, azul ácido 93. No debe confundirse con azul de metileno.

solución acuosa de eosina ⁸⁷
(o floxina B ⁸⁸) al 1 % 23 ml
agua destilada 49 ml

Procedimiento de la tinción de Mann

Se tiñe durante 24 horas a la temperatura del laboratorio o durante 6 a 14 horas a 38 °C. Se lava con agua corriente y después, rápidamente, con etanol absoluto.

Para la diferenciación se utiliza la siguiente solución alcohólica de sosa cáustica:

solución al 1.5 % de sosa cáustica
en etanol 1 ml
etanol absoluto 30 ml

Se deja el corte en esta solución hasta que se colorea en rosa, aproximadamente 10 minutos. Cuando aparece este color, la muestra se lava en agua corriente. El corte debe adoptar un color azul celeste, de lo contrario, se trata durante un minuto con una solución de agua y ácido acético ⁸⁹.

Se deshidrata rápidamente con etanol absoluto, se trata con xileno y se monta en bálsamo de Canadá o DPX.

Resultados de la tinción de Mann

Los cuerpos de Negri se observan de un color rojo bermellón, los nucleolos de las neuronas de color rojo violáceo, la cromatina azul, las células azul oscuro, el estroma azul pálido y los eritrocitos de color rosa. Si se reemplaza la eosina por floxina B en la misma proporción, destacan más los cuerpos de Negri.

TÉCNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES

Es una prueba inmunológica, rápida y confiable. Sin embargo, debe recordarse que todos los *Lyssavirus* comparten grupos antigénicos, lo que resulta en reacciones cruzadas. Luego

⁸⁷ C.I. 45380.

⁸⁸ C.I. 45410.

⁸⁹ Dos gotas de ácido acético en 40 ml de agua destilada.

entonces, es factible que los resultados positivos en cerebros de caballos, en realidad correspondan a la presencia de un *Lyssavirus* equino diferente al virus rábico, con las implicaciones imaginables.

La prueba de anticuerpos fluorescentes se utiliza para detectar antígeno rábico en tejidos, con fines diagnósticos e investigación. El fundamento consiste en marcar el anticuerpo con un fluorocromo, dejar que el anticuerpo marcado reaccione con el antígeno *específico* de rabia y el resultado de la reacción se observa con el microscopio de fluorescencia.

Para esta prueba se necesita un microscopio de luz ultravioleta, conjugado de buena calidad y un técnico experimentado.

Se utilizan los siguientes reactivos:

Conjugado antirrábico

Suele ser distribuido por los servicios de salud pública de cada país. Consiste en un suero hiperinmune más isotiocianato de fluoresceína; el colorante está agregado de acuerdo a la cantidad de proteína presente. El suero hiperinmune se obtiene al inmunizar con virus rábico atenuado diferentes especies animales, como el conejo, hámster, caballo, etc.

Suspensión de cerebro de ratón normal de 21 días

Suele ser proporcionado por los servicios de salud pública de cada país. Se puede preparar de la siguiente manera:

Se sacrifican los ratones, se extraen los cerebros, se hace una suspensión al 20% con solución de albúmina bovina fosfatada (*BAPS*) o con solución salina amortiguada con fosfatos. Los cerebros se homogenizan, luego se centrifugan a 1000 r.p.m. en una centrífuga clínica durante 10 minutos, el sobrenadante se distribuye en tubos de plástico con tapón de rosca a un volumen de 0.8 ml y se conservan a - 20 °C hasta su uso.

Suspensión de cerebro de ratón infectado

Suele ser proporcionado por los servicios de salud pública de cada país. Se puede preparar de igual forma, utilizando cerebros de ratones de 21 días de edad, inoculados por vía intracerebral (**Figura 5**), con una suspensión de virus fijo cepa *CVS* (*Challenge Virus Strain* = cepa de virus de exposición). Los cerebros se colectan cuando los ratones muestran signos paralíticos y están moribundos. Para hacer la suspensión se procede de la misma manera. Esta suspensión de ratón infectado debe tener un título viral mayor de 10^5 .

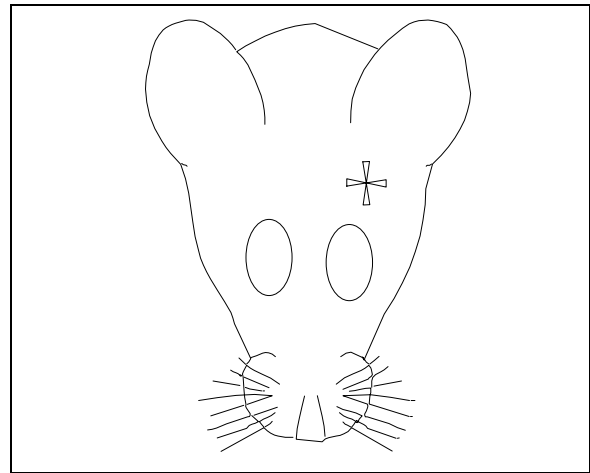


Figura 5. Sitio de inoculación en el ratón.

Procedimiento para la técnica de anticuerpos fluorescentes

El conjugado viene liofilizado y debe reconstituirse a su volumen original con agua destilada.

Para la adsorción del conjugado se adicionan 0.2 ml del conjugado diluido a los 0.8 ml de la suspensión al 20 % de cerebro de ratón normal, de igual forma se adicionan 0.2 ml del conjugado a 0.8 ml a la suspensión al 20 % de cerebro de ratón infectado, se incuban a temperatura ambiente durante 20 minutos y quedan listos para usarse.

Preparaciones testigo

Las improntas testigo positivas se pueden preparar con cerebros enteros de ratones o de hámster jóvenes inoculados por vía intracere-

bral (*Figura 5*) con virus rábico fijo y sacrificados antes de morir. Las laminillas se fijan en acetona durante 24 horas, se sacan y se conservan en seco a - 20 °C, hasta que se utilicen.

Improntas problema

Con tijeras se obtienen pequeños cortes transversales de tejido cerebral (hipocampo, corteza, cerebelo, médula oblonga), se colocan sobre un abatelenguas con la superficie de corte hacia arriba. Para obtener improntas de glándulas salivales es necesario picarlas finamente con un bisturí hasta obtener una pasta. Se aplica un porta-objetos sobre la superficie de corte presionando con suavidad, para que quede sobre el vidrio una impronta delgada. Se hacen dos impresiones en cada laminilla. Se recomienda realizar improntas dobles de cada corte de tejido, o también se puede hacer un macerado de las diferentes muestras encefálicas y realizar varias improntas. Las laminillas se secan al aire.

Si las muestras se han recibido en solución salina glicerinada al 50 % como conservador, es necesario lavarlas varias veces con agua corriente de la llave y por último con solución salina. La glicerina puede falsear la prueba, ya que tiende a combinarse con la acetona y ocultar la fluorescencia. En estos casos se obtienen buenos resultados omitiendo la fijación con acetona.

Fijación de las improntas

Las laminillas con las improntas se colocan en una jarra o vaso de Coplin que contenga acetona fría y se mantienen en un congelador entre - 15 °C y - 20 °C, durante 30 minutos. Se secan al aire y cada impresión se delimita con un lápiz marcador de cera o con barniz para uñas.

Tinción de las improntas

Una impronta de cada laminilla se tiñe depositando una gota con conjugado absorbido con la suspensión de ratón infectado y la otra impronta se tiñe con una gota de conjugado

adsorbido en la suspensión de cerebro de ratón normal, de igual forma se tiñe la laminilla testigo de un caso positivo de rabia (*Figura 6*).

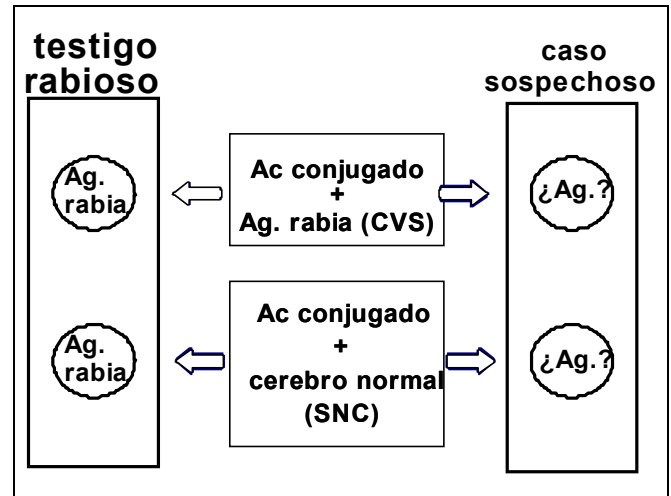


Figura 6. Laminillas testigo + y problema.

Incubación

Las laminillas se colocan inclinadas en una cámara húmeda, colocando un pedazo de papel absorbente humedecido en la parte posterior. La cámara se coloca en posición vertical en una estufa a 37 °C, durante 30 minutos, o al medio ambiente durante una hora. Así se realiza la reacción antígeno-anticuerpo sin que se seque el conjugado.

Enjuague

Después de la incubación, se enjuagan las preparaciones sumergiéndolas varias veces en solución salina amortiguada con fosfatos a pH 7.4; posteriormente se enjuagan con agua destilada.

Montaje

Se secan a temperatura ambiente, en posición vertical. A las improntas se les deposita una gota de glicerina al 90 % amortiguada con fosfatos y con pH de 8.5, se coloca un cubre-objetos y queda lista para la observación al microscopio.

Interpretación de resultados

En las improntas testigo positivas y en las improntas problema que contengan antígeno rábico se observan partículas de color verde manzana o amarillo verdoso con fluorescencia brillante, que tiende a ser ligeramente más opaco hacia el centro, sobre un fondo oscuro que puede o no contener material fluorescente no específico. La utilización de filtros puede modificar las características y la intensidad del color (*véase la página 56*). Las partículas se observan de diferentes tamaños, cuando son minúsculas se les conoce como polvo antigénico, mientras que las partículas grandes corresponden a los cuerpos de Negri.

Antes de examinar las improntas problema se deben de examinar las improntas testigo positivo y testigo negativo, para comprobar que el microscopio, accesorios y conjugado están funcionando correctamente (*Figura 7*).

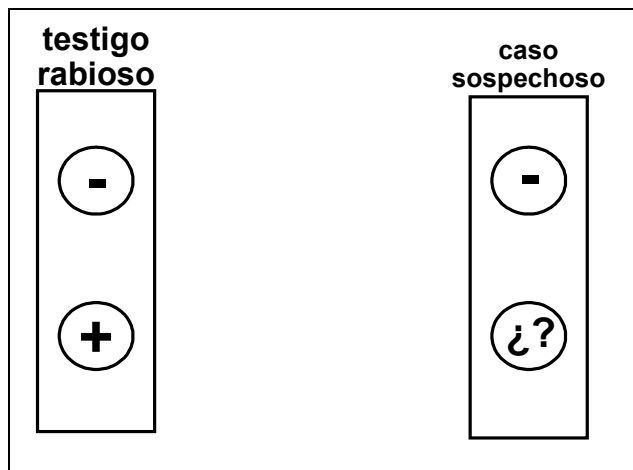


Figura 7. Lectura de laminillas testigo + y problema.

No se debe observar fluorescencia en las improntas teñidas con conjugado adsorbido en cerebro de ratón infectado con *CVS*. Este procedimiento es importante para determinar la especificidad de la fluorescencia y evitar los resultados falsos positivos (*Figura 7*).

Esta prueba tiene aproximadamente un 98 % de exactitud. Se pueden trabajar muestras muy autolisadas, pero en caso de que resulten negativas a rabia, no se puede

excluir la infección rábica. Siempre que esta prueba resulte negativa y haya exposición al hombre, se recomienda realizar la prueba de inoculación en ratón.

INOCULACIÓN EN RATÓN (PRUEBA BIOLÓGICA)

Es un procedimiento diagnóstico ligeramente más sensible que la prueba de anticuerpos fluorescentes (AF). Cuando las dos pruebas se efectúan por un técnico experimentado la concordancia entre las dos es de un 99 %. Se emplea cuando un animal sospechoso mordió a una persona y la prueba de AF resultó negativa.

Nota: *La inoculación de animales de laboratorio para realizar prueba biológica no está permitida por las leyes para la prevención de crueldad hacia los animales en algunos países.*

Antiguamente se utilizaban ratones blancos de cualquier estirpe, aunque se prefería el tipo albino suizo, porque son muy susceptibles al virus rábico y fáciles de criar en el laboratorio. Se podían utilizar ratones destetados de 21 a 31 días de edad, pero resultaba preferible utilizar ratones lactantes de 3 días de edad, ya que mostraban mayor sensibilidad a la infección con virus rábico. Actualmente se inoculan cultivos *in vitro* de células de neuroblastoma susceptibles al virus rábico.

Procedimiento

Se realiza una mezcla de porciones de hipocampo (*Figura 4*), corteza y cerebelo, se maceran en un mortero manual de porcelana, utilizando arena estéril y como diluyente solución salina fisiológica con una concentración de suero de conejo del 10 al 15 %, o también se puede utilizar suero de albúmina bovina fosfatada (*Bovine Albumin Phosphate Solution = BAPS*). De igual forma se procede con las glándulas salivales, pero previamente hay que picarlas con un bisturí. Todos los di-

luyentes empleados deben de contener antibióticos⁹⁰

Se prepara una suspensión del macerado problema al 10 %; para obtener en mililitros la cantidad de diluyente que debe incorporarse, se multiplica por 9 el peso del tejido en gramos. La suspensión se centrifuga en frío durante 5 minutos a 1000 r.p.m. en una centrífuga clínica, y se obtiene el sobrenadante. El inóculo siempre debe de permanecer frío durante todo el procedimiento.

Si se emplean animales experimentales, se recomienda utilizar camadas de 10 a 15 ratones lactantes o destetados, de manera que se puedan ir sacrificando uno o dos por día.

Para la inoculación intracerebral, se utilizan jeringas para tuberculina de un ml y agujas calibre 26 o 27 y de 1.0 a 1.5 cm. de largo. Previa anestesia, a los ratones destetados se les inocular intracerebralmente con 0.03 ml y a los ratones lactantes con 0.01 ml. La aguja se introduce en el cráneo del ratón (*Figura 5*) en un punto situado en el vértice de un ángulo imaginario cuyos lados están dirigidos hacia el ojo y oreja derecha del animal. La aguja se introduce de uno a dos mm en el tejido cerebral depositando el inóculo. Los ratones se colocan en cajas previamente preparadas e identificadas.

Resultados de la inoculación

Los ratones deberán observarse durante 21 días, pero si la muestra es positiva a rabia, los animales usualmente muestran signos clínicos a partir del 5º día postinoculación. Cualquier animal muerto dentro de las 48 horas siguientes, se considera por traumatismo o causa inespecífica. Los signos clínicos de rabia en ratones inoculados son característicos (encorvamiento, pelo erizado, temblor, incoordinación de patas traseras, parálisis, postración y muerte).

Para efectos de diagnóstico se deben sacrificar diariamente uno o dos ratones a partir del 5º día de inoculados, extraer el cerebro y efectuar la prueba de AF o histológica en busca de los cuerpos de Negri. De esta forma se puede hacer un diagnóstico temprano, sobre todo en casos de ciertas cepas de virus de "calle", cuyos efectos letales tardan de una a tres semanas en manifestarse.

DIAGNÓSTICO DE RABIA EN BIOPSIAS

Antes de la aparición de los signos clínicos de rabia se ha demostrado por medio de la prueba de AF, la presencia de virus rábico en exudados, piel y otros tejidos. En los perros, las muestras de piel se pueden obtener de lunares de la cara, o piel que contenga pelos táctiles, que abarque 5 mm de superficie por 5 mm de espesor. La piel se congela y se secciona en un criostato (6 a 12 micras) y se procede a teñir de acuerdo con la técnica de AF. La fluorescencia específica se observa dentro de las células. También se pueden realizar improntas de córnea (técnica de Schneider), y se tiñen con anticuerpos fluorescentes. La fluorescencia se observa dentro de las células corneales descamadas. Un diagnóstico negativo en estas muestras no excluye la infección rábica.

SERONEUTRALIZACIÓN EN RATÓN

Debido a la propiedad que tienen algunos virus de ser muy antigénicos, inducen en el organismo la producción de anticuerpos. La reacción de neutralización se emplea para medir la capacidad de los anticuerpos de neutralizar la infectividad viral. Esta prueba se puede utilizar en investigación o en el diagnóstico y sirve para:

- Identificar al virus de la rabia y anticuerpos contra él.

⁹⁰ Dos mg de estreptomycin y 500 U.I. de penicilina por ml.

- Determinar la relación antigénica entre dos o más virus en caso de antigenicidad cruzada.
- La titulación y ensayo de la potencia de inmunoglobulinas y suero antirrábico terapéutico.
- Medir la concentración de anticuerpos en sueros de seres humanos o de animales tomados en el curso de ensayos terapéuticos de distintas vacunas.

La prueba de suero neutralización se puede realizar en monoestrato de cultivos celulares de neuroblastoma, en tubo, en placa, o bien, en animales de laboratorio (*véase la nota en la página 166*); de preferencia en ratones de 21 días, libres de anticuerpos antirrábicos. Previamente los sueros deben inactivarse en “baño María” (en camisa de agua caliente) a 56 °C durante 30 minutos para eliminar la actividad del complemento.

El fundamento de la prueba consiste en la detección de los efectos de la unión antígeno-anticuerpo. El virus y el suero se mezclan y se incuban en “baño María” (en camisa de agua caliente) a 37 °C para favorecer la unión del virus con el anticuerpo, quedando de esta manera el virus neutralizado; por lo tanto, no habrá una infección posterior en el cultivo celular o en los ratones. En caso de que el suero no tenga anticuerpos contra rabia, el virus quedará libre, siendo capaz de producir enfermedad en el animal inoculado.

Existen diferentes métodos para realizar la prueba y esta dependerá de lo que se quiera obtener. Si se emplea el método de diluciones creciente de virus y suero constante, se habla de la técnica alfa; si se usan diluciones decrecientes de suero y virus constante se habla de la técnica beta.

Para determinar la cantidad de anticuerpos antirrábicos se utiliza la técnica beta; haciendo diluciones del suero problema, al cual se le agrega un volumen igual de virus constante con título conocido, generalmente se usa el *CVS* (*Challenge Virus Strain* = cepa

de virus de desafío), que es una cepa de rabia estandarizada, que después de titulada se mantiene en ampollitas o viales de un ml, en congelación a - 70 °C en una suspensión al 20% con suero de albúmina bovina (*BAPS*). El virus debe contener de 50 a 300 dosis letales 50% por cada 0.03 ml, que es el volumen inoculado a los ratones.

Se realizan diluciones decrecientes del suero problema en tubos de ensaye, utilizando *BAPS* como diluyente. A todos los tubos se les agrega una cantidad constante de *CVS* (0.8 ml.), quedando al final diluciones quintuplas (5, 25, 125, 625, etc.); se mezclan bien y se ponen a incubar a 37 °C en “baño María” (en camisa de agua caliente) con agitador automático durante 90 minutos. En la prueba se incluye un suero de referencia, el cual generalmente es un suero hiperinmune con un título conocido de anticuerpos contra rabia. Además, se realizan diluciones del *CVS* para determinar el título durante la prueba. Debido a que el título del *CVS*, generalmente disminuye con la temperatura de incubación. Se incluye otra serie de diluciones de *CVS* a manera de control durante el periodo de incubación; estas se mantienen en hielo o refrigeración, para posteriormente realizar un ajuste. Los tubos se colocan en gradillas con hielo y se inoculan los ratones por vía intracerebral (*véase la página 166*). Por cada dilución se inoculan 6 ratones con 0.03 ml de la mezcla, utilizando una jeringa de tuberculina o de insulina de 1.0 ml, con aguja del número 27 y de 10 a 15 mm de longitud. Los ratones se colocan en cajas de acrílico transparente con viruta, alimento y agua *ad libitum*.

Cuando se utilizan cultivos celulares, se revisan diariamente los tubos o las placas para buscar sobre una lámpara a contraluz, el efecto citopático característico producido por el virus rábico. Los ratones son revisados diariamente durante 21 días, registrando en una hoja el número de vivos, muertos y enfermos; estos últimos deben de presentar

los signos característicos del virus de la rabia (pelo erizado, encorvamiento, temblor general, parálisis, etc.). La lectura generalmente se inicia alrededor del 5° día. Los resultados son recopilados para obtener el título final de seroneutralización mediante sencillos cálculos matemáticos, empleando el método de Reed y Muench o el de Karber. Al final el CVS debe de contener la cantidad suficiente de dosis letales capaz de matar al 50% de los ratones (DL₅₀). Los ratones inoculados con el suero de referencia deben sobrevivir a la inoculación.

OBSERVACIONES

La rabia es una enfermedad de notificación obligatoria en la mayoría de los países, y los casos positivos y sospechosos deben notificarse a la autoridad local de Sanidad Animal. La legislación sanitaria respecto al manejo de los animales rabiosos vivos varía de país a país, por lo que conviene consultar la legislación respectiva.

El manejo de virus rábico patógeno es un riesgo que debe tratarse adecuadamente por el personal que trabaja en un laboratorio de diagnóstico. Cada laboratorio debe dictar sus propias normas y protocolos de **bioseguridad**, basados en las normas internacionales y acordes con las leyes locales, para evitar riesgos de infecciones accidentales.

La persona encargada de practicar diagnósticos de casos sospechosos de rabia usualmente debe estar inmunizada contra el virus rábico, y debe evaluar su título de anticuerpos protectores por lo menos cada 6 meses (*véanse las página 155 del capítulo de "diagnóstico serológico de enfermedades virales" y 167 de este capítulo*). En caso de exposición accidental, se recomienda consultar las recomendaciones del comité de expertos en rabia de la Organización Mundial de la Salud. Debe evitarse el empleo innecesario de vacunas no indicadas, pues conllevan el riesgo de producir reacciones posvacunales.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Baer, M. G.: *Historia Natural de la Rabia*. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F, 1982.
- Culling, C.F.A.: *Handbook of Histopathological and Histo-chemical Techniques*. Butterworths, London, 1974.
- Kaplan, M.M. & Koprowski, H.: *La rabia: técnicas de laboratorio*. O.M.S., Ginebra, Suiza, 1976.
- Morilla, G.A. y Bautista, G.C.R.: *Manual de Inmunología*. Diana, México, D.F, 1986.
- Prophet, E.B; Mills, B; Arrington, J.B; Sobin, L.H.: *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas, Registro de Patología de los Estados Unidos de América, Washington, D.C, 1995.

Diagnóstico de parasitosis

*Beatriz Vanda Cantón
Germán Valero Elizondo*

Introducción

Identificación de helmintos

- Macroscópicamente
- Huevos en heces
- Cuenta de huevos en heces por la técnica de McMaster
- Coprocultivo
- Identificación en cortes histológicos
- Conteo de vermes gastroentéricos en cadáveres de rumiantes

Protozoarios

- Protozoarios en cortes histológicos
- Hemoprotozoarios

Ectoparásitos

- Raspados de piel
- Identificación en cortes histológicos

Observaciones

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

Existen diversos métodos para diagnosticar las parasitosis en los animales, con la ventaja que la mayoría de ellos pueden realizarse en animales vivos; si se trata de ectoparásitos, pueden obtenerse a partir de raspados o punciones de nódulos en piel, y si son endoparásitos muchos de los helmintos pueden colectarse en su fase adulta o larvaria a través de secreciones (vómito, heces, orina, expectoraciones, lavados bronquiales, etc.); también pueden diagnosticarse observando la presencia de huevos en las heces del hospedador, esto último también aplica para los

protozoarios del aparato digestivo. Si se trata de hemoparásitos, éstos pueden identificarse en frotis sanguíneos. Además de las técnicas empleadas por los parasitólogos, los patólogos pueden identificar a los parásitos en cortes histológicos. En la actualidad existen una gran cantidad de técnicas diagnósticas para los diferentes géneros de parásitos, que comprenden desde las sencillas pruebas de campo que no requieren equipo especial, hasta métodos más costosos y sofisticados como la serología o el uso de anticuerpos fluorescentes.

El avance tecnológico ha permitido que muchos de estos diagnósticos se realicen en el consultorio, donde son de gran ayuda la auscultación del abdomen, el examen macroscópico de las heces, la palpación rectal, la endoscopia y aún el ultrasonido transabdominal.

Para identificar un parásito, primero debe tomarse en cuenta la parte del organismo donde éste se encontraba, así como los signos clínicos observados en el paciente.

IDENTIFICACIÓN DE HELMINTOS

Macroscópicamente

1. Por examen de heces, vómito o contenido intestinal.
2. Para fijar a los vermes completos, se lavan en solución salina al 0.9% (S.S.), se colocan en una mezcla de alcohol caliente al 70% con glicerina al 5%, o en formol al 5% en S.S. para que se conserven bien estirados.
3. En el caso de los cestodos es importante no separar el escólex para su posterior identificación.
4. Para el caso de los tremátodos y los acantocéfalos que son más pequeños, se tratan igual pero deben ser comprimidos entre dos laminillas y aplicarles presión. También puede usarse fijador de Bouin (*véase la página 47*).

Huevos en heces

Para observar huevos y larvas de nemátodos, así como ooquistes de protozoarios, se puede llevar a cabo la técnica de flotación, que consiste en agregar 3 a 5 g de materia fecal en un vaso de plástico y diluida en 30 a 70 ml de una solución saturada de cloruro de sodio ⁹¹, se homogeniza y tamiza, colectándola en un segundo vaso, donde se deja reposar de 15 a 20 minutos; posteriormente, con un asa de alambre previamente flameada, se toman 3 gotas de la superficie y se colocan en un portaobjetos, se tiñen con yodo al 1% y se observan al microscopio.

Cuenta de huevos en heces por la técnica de McMaster

La técnica de McMaster se basa en contar los huevos presentes en una muestra de heces diluida en solución salina saturada. Los huevos flotarán dentro de la cámara de McMaster, quedando en la parte más alta de la cavidad, por lo que aparecerán en el mismo plano focal que las marcas que limitan las áreas de conteo. Es importante que tanto la muestra inicial como las submuestras de las diluciones que se realicen sean representativas.

1. Se ponen 28 ml de solución acuosa saturada de cloruro de sodio con 45 bolitas de vidrio en una jarra para agitar.
2. Se añaden 2 g de heces y se tapa.
3. Se agita la jarra hasta que se desmorone toda la materia fecal.
4. La mezcla se tamiza en una malla de alambre de 0.15 mm de apertura, recogiendo el filtrado en un recipiente. Se descarta el material fibroso atrapado en la malla.
5. Se agita el tamizado y se colecta una porción en pipeta Pasteur. Se vuelve a agitar y se colecta otra porción en una segunda pipeta Pasteur.

6. Se llenan las dos cámaras de McMaster.
7. Se cuentan los huevos visibles dentro de la cámara a la observación al microscopio.
8. Se multiplican los valores obtenidos por el factor de dilución. Dos gramos de heces en 28 ml, de los cuales 0.2 ml se observaron (0.10 ml por cámara), dan un factor de dilución de 1:50, por lo que los huevos contados se multiplican por 50 para conocer los huevos por gramo de heces (hpg).

Desafortunadamente, las cámaras de McMaster no siempre están fácilmente disponibles en todos los laboratorios. Tradicionalmente eran obsequiadas a los veterinarios por las compañías distribuidoras de parasiticidas.

También sirve para determinar el número de ooquistes de protozoarios por gramo de materia fecal. Es importante que se examinen tres muestras colectadas en tres días diferentes. Debe de tomarse con reserva la información proporcionada por los conteos de huevos, porque, por un lado, la prolificidad en la ovoposición varía según la especie, edad y condiciones locales, y por otra parte, pueden encontrarse severas infecciones con grave daño al organismo en ausencia de excreción de huevos, sobre todo en etapas tempranas de una infección aguda.

Coprocultivo

Se realiza con materia fecal positiva a huevos de nemátodos; para hacer más fácil su identificación se busca observar las larvas III. Las heces que no deben estar ni muy secas ni muy húmedas, se disgregan, se colocan en un frasco de vidrio tapado y se mantienen a 26° C por una semana, después de la cual el frasco se coloca a la luz difusa para que las larvas migren por las paredes del frasco, donde podrán recogerse con un pincel, para ser colocadas en un portaobjetos con una gota de agua, se recomienda matar a las larvas por

⁹¹ 1200 g de sal en 1000 cc de agua.

calentamiento del portaobjetos antes de ser observadas al microscopio.

Identificación en cortes histológicos

Los **platelmintos** presentan un cuerpo aplanado dorso-ventralmente y carecen de cavidad celómica, su cuerpo está lleno de células parenquimatosas. Las características que distinguen a los tremátodos de los cestodos son: el cuerpo no segmentado, ausencia de músculo en el parénquima y presencia de una ventosa oral y otra ventral.

Los **cestodos** adultos presentan un cuerpo segmentado que se divide en escólex o cabeza, cuello y estróbilo que está formado por una cadena de proglótidos en los que se observan las gónadas. Debajo del tegumento se observa una capa de tejido conectivo y por debajo de ésta se observa una capa externa de músculo liso, dispuesta circularmente y una interna en forma longitudinal. Muchas larvas de cestodos contienen cuerpos esféricos o corpúsculos calcáreos. En el caso del quiste hidatídico, éste posee una pared multilaminada.

Los **nematodos** tienen una cavidad celómica que generalmente está rodeada de músculo, su hipodermis es muy delgada y emite proyecciones o "cordones" hacia adentro, las cuales dividen en campos a la musculatura. Los ascáridos presentan cordones hipodérmicos que dividen a la musculatura en cuatro campos, en cambio, los spirúridos sólo tienen dos cordones laterales.

Conteo de vermes gastroentéricos en cadáveres de rumiantes

Básicamente, se trata de coleccionar el contenido gastrointestinal con todos los vermes adultos del abomaso y de intestinos. Se toma una fracción, se colorean los vermes para poderlos ver fácilmente contra el fondo blanco de una charola de peltre o plástico y se cuentan bajo un microscopio estereoscópico. Finalmente, se multiplica el número de

parásitos observados por el factor de dilución de la muestra empleado y se obtiene una muy buena estimación del número total de estos.

Si bien esta técnica es un poco tardada, no requiere de gran equipo y es muy confiable, por lo que se recomienda su empleo periódico en los cadáveres disponibles, para conocer el comportamiento de las cargas parasitarias a lo largo del año y el impacto de los calendarios de desparasitación.

1. El abomaso se trabaja por separado de los intestinos. Se ligan ambos extremos y se vacía el contenido dentro de una cubeta de plástico graduada en litros.
2. Se remueven, bajo el chorro de agua, usando los dedos, los parásitos que estuvieran adheridos a la pared abomasal mientras se lava con agua simple. Se guarda el abomaso para realizar digestión si quisieran identificarse estadíos inmaduros en hibernación.
3. El lavado obtenido se pasa por una malla de apertura de 0.075 mm. Se desecha todo el material que pase la malla. Se acompleta con agua hasta un volumen de 6 litros. Se puede añadir hasta un 5% de formalina para matar a los vermes.
4. Se agita vigorosamente y se toman dos muestras de 30 ml (en total el 1% del volumen).
5. Se cuentan los parásitos de cada género usando los cuadros de identificación para cada especie doméstica. Si se prefiere, los vermes presentes se pueden teñir con solución yodo-yodurada (lugol) y después se aclara la materia vegetal con tiosulfato de sodio al 5%.
6. Se multiplica el número de vermes observados por el factor de dilución para estimar la población de parásitos adultos en abomaso.
7. El intestino delgado se trabaja de forma similar, en tramos de uno a dos metros, pero

se usa la presión del grifo para lavar el contenido intestinal con los vermes hacia la cubeta

PROTOZOARIOS

Cuando se buscan organismos móviles como *Trichomonas*, se pueden observar en fresco, en el microscopio de contraste de fases o de campo oscuro. Para quistes de *Balantidium*, coccidias y *Entamoeba*, se pueden utilizar métodos de concentración, tamizando las heces y sometiéndolas a varios procesos de sedimentación o concentrándolos por la técnica de flotación descrita para los huevos de helmintos. También se ha recurrido a la inmunohistoquímica (véase la página 87) para detectar a *Toxoplasma*, *Neospora* y *Trypanosoma*, y se han empleado anticuerpos fluorescentes para diagnóstico de *Cryptosporidium* y *Giardia*, así como pruebas serológicas para amibiasis. En investigación de muchas enfermedades parasitarias se han empleado sondas génicas y la reacción en cadena de la polimerasa (véase el capítulo de “Biología molecular” en la página 92).

Protozoarios en cortes histológicos

La mayoría de ellos se identifican con la tinción de hematoxilina y eosina, sin embargo si no se tiene suficiente experiencia pueden ser confundidos con macrófagos. Algunas veces resulta más fácil ponerlos en evidencia con tinciones especiales, como *PAS* y Grocott para *Pneumocystis carinii*, o *PAS* para las amibas.

Hemoprotozoarios (*Babesia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia*, *Haemobartonella*, etc.)

Los frotis sanguíneos son la técnica más común para el diagnóstico, si se trata de animales vivos se recomienda puncionar capilares o vasos de pequeño calibre ya que los parásitos se acumulan en la microvasculatura; en el caso de cadáveres es aconsejable hacer improntas de bazo, cerebro y riñón; es

mejor centrifugar la sangre en capilares heparinizados a 12,000 rpm por 4 minutos, con el fin de concentrar la muestra. Las preparaciones pueden teñirse con cualquiera de los colorantes hemáticos como Giemsa (véase la página 76), Wright, Romanowsky o *Diff-Quick*.

Para mayor certeza en el diagnóstico, algunos autores recomiendan tomar además una muestra de sangre sin anticoagulante para obtener suero y determinar en él la presencia de anticuerpos específicos por medio de fluorescencia indirecta ó *ELISA*.

Recientemente se han implantado técnicas de gran sensibilidad para el diagnóstico de estos protozoarios, tal es el caso del *Western blot* y la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*).

ECTOPARÁSITOS

Comprenden a las garrapatas, ácaros, pulgas y piojos. El diagnóstico de estas parasitosis debe basarse en la demostración de los propios agentes, ya que clínicamente pueden confundirse con dermatofitosis o con otras dermatitis de diversa etiología.

Raspados de piel

La forma más común de obtenerlos es realizando escarificaciones o raspados profundos en la piel, en las zonas periféricas a las zonas hemorrágicas o necróticas, la muestra se aclara con una solución de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio al 2% o se tiñen con *PAS* (ácido peryódico de Schiff) y se observan al microscopio. Si se desea conservarlos sin dañar su estructura, se fijan en alcohol al 70%, o en formol al 10% en cloriformo.

Algunas veces los ácaros también se pueden observar en punciones de piel. No hay que olvidar que el *Demodex folliculorum* es un habitante normal de los folículos pilosos de muchos mamíferos, por lo que la sarna demodésica suele estar asociada a inmunodepresión.

Identificación en cortes histológicos.

Los artrópodos también pueden identificarse en cortes histológicos, donde sus principales características son:

- presencia de músculo estriado (a diferencia de los helmintos que sólo tienen músculo liso)
- cavidad corporal
- exoesqueleto quitinoso segmentado
- apéndices articulados y
- cavidad corporal.

OBSERVACIONES

El manejo de formas infectantes de parásitos patógenos para el humano es un riesgo que debe manejarse adecuadamente. Una estricta limpieza y orden en el laboratorio es vital. El material debe lavarse y desinfectarse adecuadamente. En muchas ocasiones, es preferible utilizar grandes trozos de papel a manera de mantel, que serán colectados e incinerados al final del día.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Bennett DG.: Medical examination of the digestive system relevant to purchase. *Vet. Clin. North America -Eq. Pract.* 8:387-393, 1992.
- González B. y Paasch L.: Identificación de parásitos metazoarios en cortes histológicos. *Veterinaria Méx.* 14:159-174, 1983.
- La Via WV.: Parasitic gastroenteritis. *Pediatric Annals* 23:556-560, 1994.
- Mattheuman LA, *et al*: Western blot and indirect fluorescent antibody testing for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* in sera from apparently healthy dogs. *J. South African Vet. Assoc.* 64:111-115, 1993.
- Pfeifer I B, *et al*: Diagnosis of natural infection with *Babesia caballi* in horses. *Arq. Univ. Fed. Rural Rio Janeiro* 15:105-107, 1992.
- Rispail P. y Jarry DM.: Parasitic fecal analyses. Prescription, application and interpretation of results. *Ann. Gastroenterologie Hepatol.* 29:207-212, 1993.

- Soulsby, E. J. L.: *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª Edición.* Interamericana, México, 1987.
- Toft, J.D. & Ekstrom, M.E.: Identification of metazoan parasites in tissue sections, in: Montali, R.J. / Migaki, G.: *The comparative pathology of zoo animals.* Smithsonian Institution Press, Washington, U. S. A, 1980.
- Vázquez, P. V.: Diagnóstico de nematodos del intestino de rumiantes, en: *Diagnóstico y tratamiento de las parasitosis de los rumiantes.* Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. p158, 1986.

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES DE LOS ANIMALES DOMÉSTICOS

*Antonio Morilla González
Dolores González-Vega*

- Contenido
- Introducción
- Antígeno
- Suero
- Pruebas de inmunidad celular para el diagnóstico
- Fundamento de las pruebas más comunes
- Características que deben reunir las pruebas de inmunodiagnóstico
- Fallas en la detección de anticuerpos
- Consideraciones sobre un resultado positivo
- Inmunodiagnóstico de poblaciones o seroperfiles
- Buenas prácticas de laboratorio
- Validación de una prueba
- Propiedades de las pruebas de diagnóstico
- Sensibilidad inmunológica de algunas pruebas
- Concordancia entre dos pruebas (Kappa)
- Referencias
- Pruebas de diagnóstico comerciales
- Directorio de laboratorios de diagnóstico en México

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico (del griego *diagnostikós* = distinguir) inmunológico de las enfermedades infecciosas consiste en demostrar una infección pasada o presente en un animal o una población, utilizando diversos métodos. Se basa esencialmente en la capacidad que tiene el sitio activo de los anticuerpos o del receptor de los linfocitos, de reconocer en forma específica al epítipo del antígeno de un germen. Una vez que ocurrió el reconocimiento específico por el anticuerpo o el linfocito, se debe hacer manifiesto y de preferencia cuantificable, por medio de diferentes técnicas.

Tradicionalmente cuando se necesitaba establecer en el laboratorio una prueba para el diagnóstico de una enfermedad, se empezaba desde la obtención y purificación del antígeno, la preparación de los reactivos y se buscaban técnicas que pudieran ser de fácil aplicación; se le determinaba su sensibilidad y especificidad, se comparaba con una o varias pruebas estándar y una vez validada se utilizaban en el campo para así obtener resultados confiables. Actualmente es posible conseguir antígenos, reactivos o kits de diagnóstico comerciales para el diagnóstico de la mayoría de las enfermedades importantes de los animales domésticos.

Estos reactivos comerciales poseen un elevado grado de tecnología, son muy confiables y constituyen un ahorro considerable de tiempo y en ocasiones de dinero. Han casi eliminado la necesidad de elaborar antígenos, de establecer ciertas técnicas por ejemplo cultivos celulares, que son de un costo elevado y que requieren de equipos, reactivos y personal altamente especializado.

El objetivo de este capítulo es presentar algunos conceptos que se utilizan en el diagnóstico inmunológico principalmente de las enfermedades de los animales domésticos.

ANTÍGENO

El antígeno es la porción de un microorganismo o parásito que contiene sitios específicos de reconocimiento de la rama humoral (anticuerpos) o celular (linfocitos) de las respuesta inmune. Estos sitios se les denomina epitopos. Los denominados antígenos crudos generalmente son extractos solubles de los microorganismos o parásitos. Están constituidos por un gran variedad de componentes, tanto del agente como de las células en que se aloja o del medio de cultivo. En un antígeno crudo la gran mayoría de los componentes son irrelevantes, pero pueden ser reconocidos por anticuerpos o linfocitos inducidos por otros microorganismos o parásitos y dar reacciones falsas positivas o negativas, por lo que es deseable tratar de purificar los antígenos.

Lo más conveniente es utilizar antígenos más definidos. Una posibilidad en caso de parásitos es el utilizar los productos de excreción/secreción, que tienen un menor número de componentes y evitar que existan reacciones cruzadas. Todavía se pueden purificar más los antígenos relevantes utilizando métodos bioquímicos o por medio de anticuerpos monoclonales en columnas de inmunoadsorción. Por ejemplo, para el diagnóstico de la triquinosis se utiliza un ELISA con un antígeno purificado por cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo monoclonal. Un método alternativo ha sido la obtención de antígenos a partir de gérmenes recombinantes; por ejemplo, en la CTB-ELISA para Fiebre Porcina Clásica (FPC), el antígeno es un Baculovirus al que se le insertó el gen E1 del virus de la FPC para que exprese el epitopo. De esta manera el antígeno reconoce a los anticuerpos, pero además al no ser infeccioso, no representa peligro para la población porcina, en zonas donde se ha erradicado la enfermedad.

Por otra parte, en ocasiones no se puede purificar el antígeno con facilidad por lo que se utiliza un antígeno crudo. En este caso se puede recurrir a varios métodos para incre-

mentar la especificidad, por ejemplo la inmunoelectrotransferencia. En esta técnica los componentes del antígeno crudo se separan por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida, se transfieren a membranas de nitrocelulosa y se hacen reaccionar con el suero problema. La especificidad en este caso está dada por el patrón de reconocimiento de antígenos por los anticuerpos del suero. También, se pueden utilizar pruebas de ELISA tipo competitivo; por ejemplo en la enfermedad de Aujeszky de los cerdos, se ha desarrollado un ELISA competitivo que detecta anticuerpos contra el antígeno gE para diferenciar animales vacunados de los infectados. Se adiciona el suero del animal a un pozo sensibilizado con los antígenos del virus y para determinar si había anticuerpos contra el gE, se adiciona un monoclonal anti gI marcado con una enzima. La prueba es positiva si el monoclonal no se pega al epitopo ya que estaba ocupado por los anticuerpos del cerdo.

Los antígenos crudos se deben usar en pruebas serológicas de baja sensibilidad que necesitan de una gran cantidad de anticuerpos para dar una reacción visible, por ejemplo inmunodifusión en agar (Cuadro 1). En este caso, la mayoría de los anticuerpos de reacción cruzada se encuentran en baja concentración por lo que no se llega a observar una reacción de precipitación visible. Pero esta prueba, a pesar de tener baja sensibilidad puede llegar a tener gran especificidad. Conforme se purifican los antígenos, también se pueden ir utilizando pruebas de mayor sensibilidad. Las pruebas muy sensibles reconocen cantidades muy pequeñas de anticuerpos en el suero y si el antígeno específico está muy contaminado con otros, entonces va a disminuir la especificidad de la prueba.

Por otro lado, deben estudiarse las características del antígeno o los antígenos importantes, pues dependiendo de ellos se puede escoger la prueba; por ejemplo si se usa una prueba de hemaglutinación pasiva, el antígeno serológico debe competir con los

irrelevantes en cuanto a unirse al eritrocito; quizá este antígeno se adhiera mejor al plásmico por lo que sería mejor establecer una prueba de ELISA o de aglutinación de partículas de látex. Si el antígeno no tienen movilidad electroforética adecuada debido a una carga negativa muy débil o nula, no es recomendable usar la contraelectroforesis.

SUERO

La sangre posee en una porción líquida, denominada plasma en el cual flotan diferentes células y elementos como los glóbulos rojos, blancos y las plaquetas. Si se impide la coagulación de la sangre por la adición de un anticoagulante, las células pueden ser eliminadas por centrifugación y se obtiene el plasma.

Cuando la sangre se deja coagular, se forma una malla de fibrina que atrapa a las células y libera el líquido denominado suero. El suero es similar al plasma pero ya no está presente el fibrinógeno. El plasma y el suero contienen los anticuerpos que son los que se utilizan para el diagnóstico serológico.

A partir de la sangre se obtienen los linfocitos, por ejemplo para determinar el interferón gama; también de sangre completa, plasma o suero se efectúa el reconocimiento de antígenos circulantes, por ejemplo el virus de la Leucemia Felina o el de la Fiebre Porcina Clásica.

Aproximadamente el 10% de las proteínas del suero corresponde a la fracción gammaglobulina, en la cual se encuentran los anticuerpos. Se ha calculado entre 10^8 a 10^9 diferentes especificidades de estos anticuerpos dirigidos hacia ese mismo número de epitopos. Conforme haya sido la exposición del animal hacia esos antígenos así será la concentración de anticuerpos dirigidos hacia esos epitopos en particular. Cuando un animal recibe un estímulo antigénico, en cuestión de horas recluta células plasmáticas que empiezan a producir los anticuerpos específicos que

son vertidos a la circulación. Lentamente se incrementa el nivel de anticuerpos en el plasma hasta que dependiendo de la sensibilidad de la prueba serológica, pueden llegar a ser detectados. En general este período es de alrededor de 5 a 7 días con la mayoría de las pruebas inmunológicas. La primera inmunoglobulina que aparece es la IgM, seguida de la IgG, y cada una tiene propiedades que las diferencian entre sí. Los anticuerpos tempranos de la respuesta primaria tienen en general menos reacciones cruzadas que los tardíos; esto es debido a que son de baja afinidad y representan una población de anticuerpos que aparecen como respuesta contra los antígenos dominantes del agente. Son principalmente de la clase IgM, aunque también hay IgG. Posteriormente aparecen los anticuerpos tardíos, que son IgG de mayor afinidad; éstos constituyen un mayor número de poblaciones de anticuerpos, ya que además de reconocer a los antígenos inmunodominantes también reconocen a otros menos inmunogénicos o que son internos. La mayor variedad de especificidades de los anticuerpos hace que puedan llegar a reconocer a otros antígenos no relacionados. Por otro lado, es posible determinar si los anticuerpos son tempranos de la clase IgM, tratando al suero con sustancias reductoras como el mercaptoetanol, que destruye la actividad aglutinante, en comparación con los tardíos de la clase IgG y que son resistentes. De esta manera se puede diferenciar una infección reciente de una crónica, por ejemplo en brucelosis.

PRUEBAS DE INMUNIDAD CELULAR PARA EL DIAGNÓSTICO

Se basan en la capacidad que tienen los linfocitos sensibilizados para que al reconocer un antígeno, liberen linfocinas con diferentes actividades, o muestren capacidad citotóxica. Estas manifestaciones se pueden reconocer *in vivo* o *in vitro*. En el animal la prueba más popular es la intradermorreacción pues es fácil de efectuar, barata y en general produce bue-

nos resultados. En el laboratorio, las pruebas *in vitro* que se utilizan más comúnmente son la transformación blastoide y recientemente se desarrolló un ELISA comercial que detecta la liberación de interferón gama producido por linfocitos T. Aunque las pruebas de diagnóstico basadas en la inmunidad celular se han tratado de simplificar, siguen teniendo la desventaja que se requiere de un laboratorio que tenga condiciones de esterilidad para el mantenimiento de las células inmunes viables, un laboratorio de radioisótopos para determinar la multiplicación celular, además son cualitativas por lo que no se puede establecer el grado de respuesta y sólo se puede trabajar con pocos animales.

FUNDAMENTO DE LAS PRUEBAS MÁS COMUNES

Sueroneutralización

En esta prueba los anticuerpos del suero neutralizan a un virus y cuando se inocula en cultivos celulares, animales u otro sistema biológico indicador, no se multiplica. Se considera como la prueba “estándar de oro” pues los anticuerpos neutralizantes son los más específicos contra un virus.

Precipitación

Los antígenos solubles en presencia de anticuerpos de la clase IgG forman una malla insoluble, que se puede observar dependiendo del soporte en el cual se efectúa la prueba; si es en tubo el contenido se hace opalescente, en tubo capilar se observan grumos, o en agar se aprecian bandas de precipitación

Un ejemplo es la prueba de inmunodifusión en agar para detectar anticuerpos contra el virus de la influenza aviar o la prueba de Coggins para la Anemia Infecciosa Equina.

Los resultados se expresan como la dilución más alta del suero en el que se observa precipitación.

Aglutinación

Las partículas insolubles que poseen antígenos sobre su superficie, en presencia de anticuerpos IgM o IgG se aglutinan. La aglutinación se puede clasificar como directa o indirecta. En la directa los anticuerpos aglutinan al antígeno que puede ser una bacteria, glóbulos rojos, células, etc. y en la indirecta se utiliza un soporte insoluble por ejemplo, glóbulos rojos o partículas de látex a los que se les adsorbe el antígeno sobre su superficie.

Las pruebas se llevan a cabo mediante diluciones dobles del suero en presencia de una cantidad constante de antígeno. Los resultados se expresan como la dilución más alta de suero en la que se presenta la aglutinación.

Esta prueba se utiliza para el diagnóstico de la brucelosis.

Inhibición de la hemaglutinación

Existe una variante de la aglutinación que es la inhibición de la hemaglutinación (IH). Se utiliza con virus hemoaglutinantes como el de Influenza aviar, de la enfermedad de Newcastle, adenovirus, Encefalitis Equina Venezolana, del Este y del Oeste, Parvovirus porcino y otros virus.

En esta prueba los componentes son el antígeno hemaglutinante (HA), diluciones decrecientes de suero y glóbulos rojos. El suero con los anticuerpos, inhiben la hemaglutinación de los glóbulos rojos sensibilizados con el virus.

Los resultados se expresan como la dilución más alta de suero que inhibe la aglutinación y se utiliza para cuantificar a los anticuerpos IH presentes en un suero.

Fijación del complemento

Se ha utilizado para determinar la presencia de anticuerpos en el suero o de antígenos en un tejido. En el caso del suero, los anticuerpos se unen al antígeno y consumen el complemento presente en el suero. Para reconocer que esta reacción ocurrió se utiliza un sistema

indicador que consiste en adicionar glóbulos rojos sensibilizados con anticuerpos (hemolisina). Si en la primera reacción no hubo anticuerpos contra el antígeno, no se consumió el complemento y por lo tanto quedó disponible para la segunda reacción y lisa los glóbulos rojos; se cuantifica la cantidad de hemoglobina libre por medio de un colorímetro. En caso de que en la primera parte hubiera ocurrido una reacción entre el antígeno y el anticuerpo, el complemento se consumió y al no quedar disponible para la segunda parte, los glóbulos rojos sensibilizados no se lisarán y el sobrenadante permanecerá claro.

Los resultados se expresan como la dilución más alta de suero que consumió el complemento, como correlación de la presencia de anticuerpos específicos para el antígeno.

Se utiliza para el diagnóstico serológico de diversas enfermedades tales como Bruceosis, Fiebre Aftosa, Muermo, Durina y Piroplasmosis entre otras.

Para determinar la presencia de un antígeno en un tejido, por ejemplo el virus de la Fiebre Aftosa en vesículas de un bovino sospechoso, se hace una suspensión del tejido, se adiciona un antisuero específico y el complemento. Posteriormente se adiciona el sistema indicador. Si el antígeno estaba presente se consume el complemento y no se presenta la lisis de los glóbulos rojos.

Inmunofluorescencia

El fundamento se basa en utilizar un anticuerpo conjugado con fluoresceína y cuando reconoce al antígeno, la reacción se puede visualizar con un microscopio de luz ultravioleta. En esta sección sólo se van a revisar las pruebas directas e indirectas.

Directa. Se utiliza para localizar un antígeno en un tejido. En esta técnica el antisuero conjugado se pone sobre una sección de tejido donde se encuentra el antígeno el cual se puede visualizar por medio del microscopio de luz ultravioleta. Por ejemplo el virus

de Rabia en el cerebro de un mamífero o el de la Fiebre Porcina Clásica en las tonsilas de los cerdos.

Indirecta. Se puede utilizar para localizar un antígeno o para determinar la presencia y concentración de anticuerpos en un suero. En esta técnica, el antígeno se coloca sobre un portaobjetos, se hacen diluciones dobles del suero problema y posteriormente se adiciona un antisuero contra la gamaglobulina de la especie, conjugado con fluoresceína, para visualizar al anticuerpo pegado al antígeno. Se observa la fluorescencia con el microscopio de luz ultravioleta. El título de un suero es la última dilución en la que se puede observar fluorescencia. Se puede utilizar para titular sueros de bovinos contra *Babesia bigemina* o *B. bovis* o Toxoplasmosis.

Ensayos inmunoenzimáticos o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Assay*)

Con estas pruebas se utilizan reactivos marcados con enzimas que actúan sobre el sustrato/cromógeno que dan productos coloreados. De esta manera, el reconocimiento del antígeno por unas cuantas moléculas de anticuerpos marcadas con la enzima, pueden ser visualizadas por el efecto amplificador de la reacción, pues en el pozo donde ocurre se manifiesta el cambio de color. Existe una gran variedad de posibilidades con estas pruebas. En esta sección sólo se van a revisar la indirecta, la competitiva, la de captura y la de mancha.

Indirecta. Se utiliza para determinar la presencia de anticuerpos en un suero. El antígeno se adsorbe al pozo de una placa, se adiciona el suero y los anticuerpos se pegan al antígeno. Para reconocer al anticuerpo se adiciona otro, pero dirigido contra la gamaglobulina de la especie animal y marcado con una enzima, por ejemplo peroxidasa; este anticuerpo reconoce al que se encuentra pegado al antígeno y cuando se adiciona el sustrato de la enzima y el cromógeno, se produce

un producto coloreado que se puede leer en el espectrofotómetro. Un ejemplo es la prueba de ELISA para detectar anticuerpos contra la leucosis bovina.

Competitiva. Se utiliza para determinar la presencia de anticuerpos en un suero y tiene la ventaja que puede llegar a ser mucho más específica que la indirecta cuando se combina con anticuerpos monoclonales. El antígeno se adsorbe al pozo de una placa, se adiciona el suero problema y si hay anticuerpos, éstos cubren al antígeno. Para reconocer si los anticuerpos del suero se pegaron al epitopo del antígeno, se adiciona un anticuerpo monoclonal específico marcado con una enzima; si el epitopo está cubierto por los anticuerpos, el monoclonal no se pega y cuando se adiciona el sustrato de la enzima y el cromógeno no se desarrolla color. Si no hubo anticuerpos en el suero, el epitopo se mantiene libre y el monoclonal lo reconoce; cuando se adiciona el sustrato de la enzima y el cromógeno y el monoclonal se encuentra pegado al epitopo, se produce un producto coloreado que se puede leer en el espectrofotómetro e indica que el suero no contenía anticuerpos. Un ejemplo es la ELISA competitiva gE para detectar anticuerpos contra el virus de campo de la enfermedad de Aujeszky.

De captura. Se utiliza para reconocer a un antígeno, por ejemplo Rotavirus en heces de bovinos. En este caso el pozo se encuentra sensibilizado con un anticuerpo contra el antígeno, se adiciona un muestra diluida de heces y si se encuentra el rotavirus lo captura el anticuerpo. Se adiciona un segundo anticuerpo contra el Rotavirus conjugado con una enzima y se adiciona el sustrato/cromógeno. Si hubo Rotavirus el pozo va a desarrollar color.

De mancha (Dot ELISA). Con esta técnica la reacción antígeno anticuerpo se visualiza como una mancha sobre una membrana, por lo que no se necesita colorímetro. El fundamento es que los antígenos o anticuerpos se

encuentran inmovilizados en una membrana y éstos pueden capturar o los antígenos o los anticuerpos. En esta sección se presentan los fundamentos de cuatro técnicas comerciales, como ejemplo de la sencillez con que se pueden realizar en el campo sin necesidad de un laboratorio especializado.

Para el diagnóstico de la brucelosis, en la prueba *BaCITE (IDEXX)* el antígeno de *B. abortus* y una mezcla de antígeno con tres diluciones de anticuerpos de bovino contra la brucela como control, se encuentran embebidos en diferentes zonas de la membrana. La muestra de suero de bovino se aplica en la zona del antígeno de la membrana y los anticuerpos si están presentes, son capturados por el antígeno de *Brucella* inmovilizado. Se adiciona un conjugado anti inmunoglobulinas de bovino conjugado con una enzima y después del lavado, se adiciona el sustrato/cromógeno. El color se desarrolla de acuerdo a la concentración de anticuerpos contra *B. abortus* capturados. Se compara el color de la muestra con los testigos.

Para la detección del Parvovirus canino (Probe Parvo IDEXX) se efectúa una extracción de heces del perro, se adiciona a la membrana en la que se encuentran embebidos anticuerpos monoclonales anti parvovirus. El virus se pega y se adiciona un anticuerpo monoclonal anti parvovirus conjugado y el sustrato/cromógeno; si hubo virus en la muestra aparece una mancha. La intensidad del color es proporcional a la concentración de parvovirus en las heces. Se compara el color de la muestra con el de los testigos.

Para la detección del virus de la leucemia felina (Snap FeLV IDEXX) la membrana tiene embebidos anticuerpos monoclonales anti p27. Se pone una muestra de sangre, plasma o suero del gato y si hay virus se pega; se adiciona un anticuerpo monoclonal anti p27 conjugado con una enzima y el sustrato; si hubo virus en la muestra aparece una mancha. La intensidad del color es proporcional a la concentración de virus en la san-

gre. Se compara el color de la muestra con el de los testigos.

Este tipo de prueba también se utiliza para detectar la concentración de IgG en potros. Para esto, la membrana está embebida con anticuerpos policlonales contra la IgG del equino. La muestra de suero del potro se adiciona a la membrana, se pone un conjugado anti inmunoglobulinas de equino conjugado con una enzima y el sustrato. La intensidad del color es proporcional a la concentración de IgG en el potro. Se compara el color de la muestra con el de los testigos.

Una variante del ELISA de captura es el que se utiliza para determinar la producción de interferón gama por los linfocitos T sensibilizados. En el caso de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis* Gamma-Interferon Test Kit, IDEXX) se coloca una muestra de sangre completa de bovino con PPD, los linfocitos producen interferón gama que es capturado por monoclonales pegados al pozo. Se lava y se adiciona un monoclonal anti interferón gama marcado con una enzima y el sustrato/cromógeno. En caso de que el bovino haya tenido linfocitos sensibilizados contra *M. tuberculosis* en el pozo va a parecer color.

CARACTERÍSTICAS QUE DEBEN REUNIR LAS PRUEBAS DE INMUNODIAGNÓSTICO

- a. La prueba debe utilizar pequeñas cantidades de suero y de antígeno. En la mayoría de los casos se cuenta con gran cantidad de suero y poca de antígeno. En general es difícil obtener antígeno en gran cantidad, como es el caso de las babesias, estados larvarios de algunos parásitos como *Fasciola hepatica* o virus; en otras ocasiones algunas bacterias, virus o parásitos no crecen fácilmente en sistemas *in vitro* o los antígenos específicos deben ser purificados a partir de los crudos, obteniéndose cantidades muy pequeñas.
- b. La prueba debe ser sensible para detectar niveles bajos de anticuerpos y específica para los anticuerpos que se buscan. Cuanto más purificado sea el antígeno, más disminuirán las reacciones cruzadas con otros irrelevantes y por lo tanto, la prueba resultará más específica. Cuando se usan antígenos complejos en pruebas muy sensibles, fácilmente se producen reacciones cruzadas.
- c. La prueba debe ser estandarizada y validada con relación a la especie animal con que se esté trabajando. Aunque los animales domésticos responden produciendo anticuerpos, éstos no se comportan en forma idéntica en cada una de las pruebas inmunológicas. Por ejemplo, dependiendo de la especie animal de los anticuerpos deberá ser la fuente del complemento, unas especies animales responden con títulos elevados de anticuerpos precipitantes hacia un agente y otras no. En el caso de algunos tipos de pruebas intradérmicas, los tiempos de máxima inflamación que se deben utilizar para hacer la lectura dependen de la especie animal, y además no todas las especies responden adecuadamente.
- d. La prueba debe ser reproducible. Se deben obtener los mismos resultados en pruebas repetidas de la misma muestra y por diferentes laboratorios.
- e. La prueba debe ser sencilla de aprenderla y llevarla a cabo.
- f. La prueba no debe ser afectada por factores inespecíficos. El suero y diversos líquidos del organismo contienen aglutininas, sustancias inhibitoras de la aglutinación, sustancias neutralizantes, anti-complementarias o tóxicas que causan falsos resultados. Generalmente los factores inespecíficos se encuentran en bajas concentraciones y se eliminan a través de la dilución del suero. Por este motivo las pruebas serológicas se consideran positivas sólo desde cierta dilución del suero

en el que se observa actividad. Por ejemplo, en el caso de la babesiosis bovina, se considera positiva la prueba de hemaglutinación pasiva cuando el título del suero es de 1:64 en adelante, y se descartan las diluciones de 1:2 hasta 1:32 en que si hay aglutinación, se considera negativa o inespecífica.

- g. El equipo y los reactivos que se utilicen en la prueba deben ser fáciles de conseguir, baratos y de larga duración. Actualmente existe un gran número de pruebas comerciales sencillas de efectuar, que requieren de equipo relativamente costoso para su realización o lectura; sin embargo, es necesario adquirirlo y además, puede utilizarse para una gran variedad de pruebas; este es el caso del lector de placas de ELISA.
- h. Los antígenos que se utilicen en la prueba, deben estar inactivados y no representar un riesgo para el personal o los animales. Tal es el caso de la rabia, el toxoplasma o el virus de la Fiebre Porcina Clásica.
- i. La prueba de elección debe ser validada con una que ya esté establecida y que sea muy confiable, también denominada “estándar de oro”. Por ejemplo, en el caso de anticuerpos contra un virus, en la mayoría de los casos el estándar de oro es la virus neutralización y una vez validados los sueros, se pueden comparar con otras como inmunodifusión en agar, contraelectroforesis o ELISA.

En los laboratorios en que existen recursos económicos limitados, en ocasiones se tratan de establecer pruebas de inmunodiagnóstico descritas en la literatura, sencillas y económicas; esto se hace con el objeto de evitar el establecer técnicas ya estandarizadas, pero que requieren un laboratorio con equipo, reactivos y personal especializado. Un ejemplo sería la virus neutralización en que se necesitan facilidades para trabajar virología y cultivos celulares. En este caso resulta atrac-

tivo preparar un antígeno a partir de una mollienda de un tejido de animales infectados que supuestamente contiene el virus y hacer una prueba de inmunodifusión en agar, donde pueden aparecer bandas cuando se pone a reaccionar con un suero. En este caso, aunque pareciera que se obtienen buenos resultados, si no se comparan con una prueba “estándar de oro” los resultados no van a ser útiles. Además, pueden ocasionar problemas pues si se aceptan como válidos, se van a encontrar animales supuestamente infectados en hatos donde no debiera haber o lo opuesto, que no se lleguen a localizar a los animales infectados en un hato y que al mantenerlos constituyan una fuente de infección para el resto de los animales.

La recomendación es que antes de montar nuevas técnicas en un laboratorio, es necesario que se tengan establecidas las que se usan como estándares internacionales, validadas en el mismo laboratorio y que se tenga experiencia acerca del tipo de los resultados que se obtienen.

FALLAS EN LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

En ocasiones los animales se encuentran infectados; sin embargo, las pruebas inmunológicas resultan negativas. Esto puede deberse a las características de la respuesta inmune del animal o a fallas en las pruebas.

En relación con la respuesta inmune se encuentra el caso de que la infección sea muy leve o se trate del principio de una infección, con niveles bajos de anticuerpos; o bien en algunos casos como la tuberculosis, pudiera ser que en los estadios finales de la enfermedad hubiera anergia y los animales no respondieran a la prueba tuberculínica. También puede suceder que la infección cause inmunosupresión y entonces no se producen anticuerpos en cantidad adecuada. Los cerdos que se infectan en el útero con el virus de la Fiebre Porcina Clásica pueden nacer inmunotolerantes y cuando se vacunan no se producen

anticuerpos En otras ocasiones los parásitos estimulan la producción de anticuerpos, pero al mismo tiempo se produce antígeno en gran cantidad que llega también a circular como complejos inmunes, que disminuyen la cantidad de anticuerpo libre disponible en la prueba. Algunos microorganismos que se encuentran localizados externamente en mucosas o enquistados, en ocasiones no logran estimular adecuadamente la producción de anticuerpos circulantes.

Por lo que toca a las fallas de la prueba, puede ser que no se haya seleccionado la técnica adecuada y le falte sensibilidad. Por lo que se refiere al antígeno, puede que no sea el adecuado, como ocurre con estadios del parásito que cambian parte de la composición antigénica durante su ciclo. También es frecuente que el antígeno que se obtenga sea muy complejo, como lo es el somático de los parásitos, y que contenga muy poco antígeno específico; debido a que la mayoría corresponde a otros componentes, éstos pueden interferir con la prueba. Una de las fallas más comunes consiste en que se maneja en forma inapropiada el antígeno y al desnaturalizarlo no puede ser reconocido por los anticuerpos. En relación con el suero es recomendable obtenerlo lo más rápidamente posible de la sangre y refrigerarlo por un período de pocos días o congelarlo hasta su uso. La IgG es muy estable a 4°C y se puede mantener por períodos muy largos siempre y cuando no se contamine. No es recomendable congelar y descongelar el suero, o el antígeno, varias veces pues se desnaturalizan; lo mismo ocurre si se forma espuma al hacer las diluciones o si el material de vidriería tiene residuos de detergente. Los anticuerpos tienden a durar menos cuando se mantienen diluidos en soluciones salinas, por lo que una vez hechas las diluciones, no se deben congelar y descongelar varias veces ni mantenerlas por mucho tiempo en el refrigerador, ya que los títulos de anticuerpos o la potencia del antígeno tendería a disminuir.

No se deben utilizar sueros contaminados o con mucha hemoglobina pues con las nuevas pruebas de alta sensibilidad y especificidad, hay mayor riesgo de que interfieran en el desarrollo de la prueba y ocasionan la aparición de falsos positivos o falsos negativos.

CONSIDERACIONES SOBRE UN RESULTADO POSITIVO

Un resultado positivo no necesariamente implica que el animal esté infectado por un agente. Puede deberse a una vacunación previa, a inmunidad pasiva por el calostro o a reacciones cruzadas con otros agentes infecciosos.

Con las pruebas de alta sensibilidad y especificidad como el ELISA competitivo se obtienen resultados falsos positivos con sueros contaminados, por errores de manejo de la muestra o de algún paso en el desarrollo de la técnica.

INMUNODIAGNÓSTICO EN POBLACIONES O SEROPERFILES

Las pruebas serológicas pueden ser aplicadas como herramienta para confirmar el diagnóstico en un animal o en una población.

Para el diagnóstico en poblaciones se recurre al muestreo serológico estratificado por edades y etapa reproductiva también denominado seroperfil y se utiliza para:

- 1) Determinar en una población si existen o no los anticuerpos específicos como correlación de la presencia de un microorganismo patógeno o parásito.
- 2) Establecer el grado de difusión del microorganismo en la población en ese momento.
- 3) Establecer cuánto tiempo se mantienen los anticuerpos maternos específicos, cuándo aparecen animales susceptibles y ocurre una infección, y el grado de infección de la población adulta.

- 4) Determinar los cambios inmunológicos de una población animal en el tiempo posibilitando un pronóstico de la enfermedad.
- 5) Establecer los programas óptimos de vacunación y evaluar su efectividad
- 6) Determinar las propiedades inmunológicas o antigénicas de los agentes etiológicos y sus variantes
- 7) Establecer las posibles interrelaciones entre diversos agentes patógenos en una población.
- 8) Monitorear a los animales al principio y al final de la cuarentena para impedir que entren gérmenes patógenos a poblaciones susceptibles.
- 9) La vigilancia epizootiológica en poblaciones libres de enfermedades.
- 10) Delimitar un foco de enfermedad en una región.
- 11) Dar seguimiento a animales centinelas que detecten la presencia de un microorganismo en una región.

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

- 1) Se deben leer con detenimiento los instructivos de los kits
- 2) Los sueros deben estar lo más limpio posibles sin hemoglobina y sobretodo no deben estar contaminados pues interfieren con el desarrollo de la prueba. Antes de utilizar el suero debe mezclarse suavemente pues con la refrigeración y el congelamiento las proteínas se sedimentan
- 3) Se debe monitorear la temperatura del laboratorio y mantenerla entre 18° a 26°C aproximadamente. La temperatura juega un papel importante en la obtención de resultados válidos pues afecta las reacciones enzimáticas. Por consiguiente cualquier condición que reduzca la temperatura del análisis, por ejemplo que los reactivos no hayan alcanzado la temperatura correcta o una temperatura ambiente demasiado baja o muy elevada, pueden causar alteraciones en las absor-

bancias y los resultados pueden ser inválidos.

- 4) Los reactivos se deben equilibrar a la temperatura del laboratorio antes de su uso
- 5) Todos los reactivos deben mezclarse antes de usar mediante inversión o agitación suave. Se debe evitar la producción de espuma pues se desnaturalizan los antígenos y los anticuerpos.
- 6) Los reactivos se deben tapar inmediatamente después de su uso y no se deben intercambiar las tapas de los reactivos.
- 7) Una vez comenzado el ensayo, todos los pasos subsecuentes deben ser completados sin interrupción, dentro de los límites de tiempo recomendados.
- 8) Los reactivos y las muestras deben ser preparadas de acuerdo con las recomendaciones del instructivo. Se deben utilizar los diluyentes específicos o agua destilada y desionizada, si así lo indica el instructivo.
- 9) La calidad del agua usada para limpiar las placas pueden afectar el rendimiento del ensayo. La presencia de iones metálicos pueden producir absorbancias elevadas para los testigos negativos. Es recomendable determinar constantemente la calidad del agua.
- 10) Se debe revisar constantemente la calibración de todas las pipetas y verificar que el nivel de muestra o reactivo pipeteados sea uniforme. Las pipetas se deben calibrar una o dos veces al año. Se debe asegurar que los tubos para el llenado y aspiración del sistema de lavado estén limpios y se deben cambiar si comienzan a enmohecerse.
- 11) Si se usa lejía para limpiar el sistema de lavado se debe asegurar que sea enjuagado perfectamente con agua destilada. La presencia de cualquier residuo puede dar resultados inválidos, debido a interferencia en la reacción con el substrato.

- 12) Las muestras y los reactivos deben ser pipeteados con precisión y deben ser depositados en la esquina del fondo de los pozos, para evitar salpicaduras. No se debe pipetear con la boca.
- 13) Se debe utilizar una nueva punta de pipeta para cada muestra o control.
- 14) El tiempo de incubación de cada placa se debe controlar con precisión con un reloj marcador. Es importante utilizar una pipeta multicanales para acortar el tiempo
- 15) Se debe poner a funcionar el aparato de lavado antes de lavar las placas para eliminar las burbujas de aire y asegurarse de la correcta salida o aspiración en todos los puertos.
- 16) Se debe efectuar sólo el número de lavados recomendados en el instructivo. Después de lavar las placas, se deben invertir y golpear con suavidad sobre una superficie con un trapo. Es importante seguir las instrucciones de las veces que se debe lavar la placa pues el que se lave más o menos veces de lo indicado, afecta la prueba.
- 17) Para prevenir la contaminación microbiana y que se tapen los puertos y tubos se debe pasar agua destilada y deionizada diariamente a través del aparato de lavado.
- 18) Es importante revisar la calibración del lector para verificar su desempeño, revisar que el cañón de filtros trabaje adecuadamente y que el filtro que utilice sea de la longitud de onda adecuada para la prueba.
- 19) No se deben tocar con los dedos ninguna de las superficies ópticas del lector como son la lámpara, lentes, detector o prisma. Para limpiar las superficies ópticas se debe utilizar un paño que no libere pelusa.
- 20) No se deben mantener los kits a temperatura ambiente más de lo necesario. Los conjugados pierden fácilmente su actividad enzimática y una vez preparados son estables sólo por un corto período (alrededor de una hora). No se debe exponer la tetrametil bencidina (TMB) y el sustrato a la luz o agentes oxidantes. Los kits deben ser almacenados a temperatura de refrigeración para mantener su estabilidad.
- 21) No se deben intercambiar los componentes de lotes diferentes de los kits o con otros tipos de kits
- 22) No se deben hacer modificaciones del protocolo de ensayo recomendado.
- 23) Es recomendable manejar los productos biológicos como si fueran infecciosos, por lo que se deben descontaminar todos los desechos antes de eliminarlos.
- 24) Se debe prevenir la contaminación de los componentes utilizando con la pipeta una punta desechable para cada muestra.
- 25) Para evitar la posible contaminación del contenido de los viales se recomienda separar en tubos de ensayo limpios la cantidad de reactivo que se va a utilizar cada vez. Limpiar las pipetas después de adicionar cada reactivo.
- 26) No se deben usar los componentes de los kits después de su fecha de expiración.
- 27) Cada vez que se ensayen muestras se deben incluir los testigos que acompañan al kit.
- 28) Además de los sueros control del kit es recomendable poner en cada ensayo testigos propios del laboratorio, por ejemplo fuerte positivos (+++), medianamente (++), débiles (+) y negativos (-) con objeto de que pueda compararse los resultados entre cada lote de kit que se utilice.
- 29) No se debe comer, beber o fumar donde se estén manipulando las muestras o los reactivos.
- 30) Las muestras y testigos deben ensayarse al mismo tiempo para garantizar las mismas condiciones de reacción.

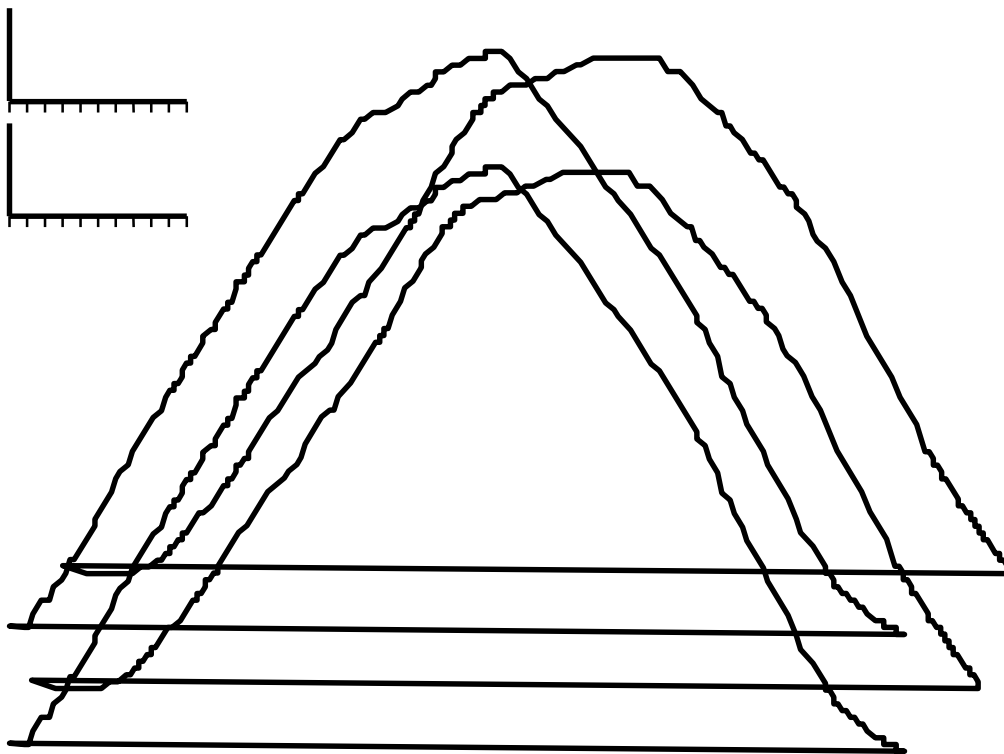
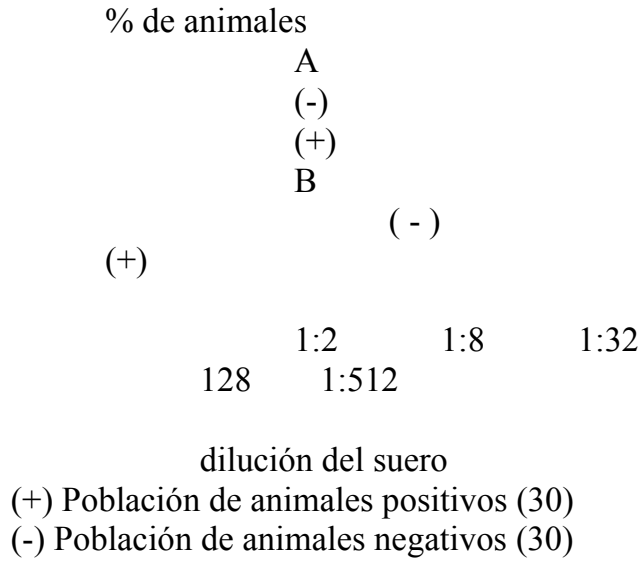
VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA

En muchos casos en que se selecciona una prueba descrita en la literatura y un antígeno para efectuar el diagnóstico inmunológico, es recomendable establecer los parámetros propios del laboratorio para el criterio de interpretación. Esto se puede hacer tomando dos poblaciones de por lo menos 30 animales, una que ya padezca la enfermedad, por ejemplo una parasitosis y que se encuentre en una zona enzoótica de la enfermedad, y otra población que no esté infectada y además que se encuentre en una zona libre del parásito en estudio. Seleccionando de esta manera se garantiza que los animales positivos y negativos efectivamente lo sean; el hecho de que un grupo de animales no tenga el parásito pero se encuentre en la zona enzoótica no es garantía de que los animales no hayan tenido un contacto previo y desarrollado una respuesta inmune, lo que falsearía la especificidad de la prueba. A los sueros de los dos grupos se les realiza la prueba, por ejemplo hemaglutinación pasiva, y se agrupan con base en la frecuencia de los títulos alcanzados; de esta manera se obtiene una curva normal para el grupo testigo y otra para el grupo parasitado (Figura 1A). Se puede observar que la mayoría de los animales, dependiendo del grupo, caen en un rango que en el caso de los negativos es de 1:2 hasta 1:64, siendo la mayoría de 1:8, y para los positivos el rango va de 1:32 hasta 1,1024 y la mayoría incide en 1:128; o sea que en esta prueba a partir de 1:64 es confiable el resultado de que detectemos a la mayoría de los positivos. Otro resultado que puede obtenerse es el que se observa en la Figura 1B, donde la prueba serológica no fue capaz de discriminar en forma confiable a los animales infectados de los no infectados, por lo que probablemente se tenga que cambiar de antígeno o de prueba.

En medicina veterinaria, debido a que con frecuencia el diagnóstico inmunológico se basa en el muestreo de hato más que del individuo, la obtención de estas curvas es

sumamente útil. Además se puede determinar si la infección es reciente o crónica, o en un muestreo pareado, si tiende a desaparecer.

Figura 1. Validación de una prueba serológica



PROPIEDADES DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

Las pruebas inmunológicas tienen diferentes características para clasificar correctamente a los animales de acuerdo con su condición sanitaria. Dentro de éstas se encuentran:

La sensibilidad, que es la capacidad que tiene la prueba de identificar correctamente a los animales que están o estuvieron infectados y la especificidad, que es la capacidad que tiene la prueba de identificar a los animales no infectados.

Para determinar las características de una prueba se requiere contar con animales que efectivamente estén o hayan estado infectados y una población libre de la enfermedad. Se obtienen los sueros, se efectúa la prueba y los resultados se anotan en una tabla de 2 x 2 de la siguiente manera:

	Animales		Total
	Infectados * I+	No infectados * I-	
P+	55 VP (a)	5 FP (b)	60 (a+b)
P-	6 FN (c)	105 VN (d)	111 (c+d)
Total	61 (a+c)	110 (b+d)	171 (a+b+c+d)

***Prueba o Estándar de Oro.** Es la condición o prueba de la que se tiene la mayor certeza; por ejemplo en este cuadro, de que efectivamente los animales tienen o tuvieron la infección que se confirmó con un diagnóstico definitivo de la enfermedad (aislamiento viral o bacteriológico, etc.).

Del cuadro se puede obtener la siguiente información:

Total de animales positivos (P+) = 60

Total de animales negativos (P-) = 111

Total de animales infectados (I+) = 61

Total de animales no infectados (I-) = 110

Los animales erróneamente clasificados por la prueba son:

- Falsos positivos (FP): aquellos animales no infectados pero positivos a la prueba (5).
- Falsos negativos (FN): aquellos animales infectados pero con resultados negativos a la prueba (6).

Los animales correctamente identificados son:

- Verdaderos positivos (VP): aquellos animales infectados y positivos a la prueba (55).
- Verdaderos negativos (VN): aquellos animales no infectados y negativos a la prueba (105).

Cálculo de las propiedades de las pruebas

$$1. \text{ Prevalencia. } \frac{(a+c)}{(a+b+c+d)} \times 100$$

$$\frac{61}{171} \times 100 = 37.5$$

Sensibilidad (Se) es la proporción de animales verdaderamente infectados (I+), que fueron correctamente identificados por la prueba.

$$Se = \frac{VP}{I+} = \frac{(a)}{(a+c)} \quad \frac{55}{61} \times 100 = 90.2\%$$

En este ejemplo, de 100 animales infectados 90.2 tendrán resultados positivos a la prueba.

Especificidad (Es) es la proporción de animales verdaderamente no infectados (I-) que fueron correctamente identificados por la prueba. O sea que fueron aquellos entre la población negativa que tuvieron resultados negativos.

$$Esp = \frac{VN}{I-} = \frac{(d)}{(b+d)} \quad \frac{105}{110} \times 100 = 95.4\%$$

En este ejemplo, de 100 animales no infectados, 95.4 tendrán resultados negativos a la prueba.

Valor predictivo positivo (VP+): Indica la proporción de los animales positivos a la prueba que están realmente infectados (I+) o

la probabilidad de que un resultado positivo sea correcto.

$$VP+ = \frac{VP}{P+} = \frac{(a)}{(a+b)} = \frac{55}{60} \times 100 = 91.7\%$$

$$P+ = (a+b) = 60$$

El resultado indica que hay una probabilidad de 91.7% que un animal esté infectado si tiene un resultado positivo a la prueba.

Valor predictivo negativo (VP-) es la probabilidad de que un resultado negativo sea correcto.

$$VP- = \frac{VN}{P-} = \frac{(d)}{(c+d)} = \frac{105}{111} \times 100 = 94.6\%$$

$$P- = (c+d) = 111$$

El resultado indica que hay un 94.6% de probabilidad que un animal no esté infectado si tiene un resultado negativo a la prueba.

- Los valores predictivos positivos y negativos dependen de la prevalencia de la enfermedad en la población.

Por ejemplo si la prevalencia de la enfermedad en vez de ser del 35.7% se reduce al 3.5% entonces se modifican los valores predictivos.

Animales

	Animales Infectados I+	No infectados I-	Total
P+	5 VP (a)	55 FP (b)	60 (a+b)
P-	1 FN (c)	110 VN (d)	111 (c+d)
Total	6 I (a+c)	165 (b+d)	171 (a+b+c+d)

$$VP+ = \frac{VP}{P+} = \frac{(a)}{(a+b)} = \frac{5}{60} \times 100 = 8.3\%$$

$$P+ = (a+b) = 60$$

$$VP- = \frac{VN}{P-} = \frac{(d)}{(c+d)} = \frac{110}{111} \times 100 = 99.1\%$$

$$P- = (c+d) = 111$$

Al modificarse la prevalencia se reduce el VP+ y se incrementa el VP-

SELECCIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Se debe utilizar una prueba con alta sensibilidad y elevado VP- en las primeras fases de un programa de erradicación para detectar el mayor número posible de animales infectados. Se corre el riesgo de que se incluyan algunos falsos positivos en ese grupo, pero tiene la ventaja que se eliminan los falsos negativos, que al no ser detectados podrían continuar difundiendo la infección.

Se debe utilizar una prueba con elevada especificidad y elevado VP+ al final de un programa de erradicación en el que se busca detectar a los animales verdaderamente infectados y eliminarlos. Al reducirse los falsos positivos no se eliminaría este tipo de animales lo que resultaría costoso. Esto es importante cuando la prevalencia es baja (<2%), en que la mayoría de los animales están libres de la enfermedad y los resultados de una prueba, aunque altamente sensible y específica, puede incluir un gran número de falsos positivos.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE ALGUNAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS (A)

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Prueba de tarjeta para brucelosis	95	98
Prueba de anillo en leche para <i>Brucella abortus</i>	90	56
Fijación del complemento para <i>Brucella abortus</i>	97	99
ELISA para <i>Brucella abortus</i>	96	99
Cultivo fecal para la presencia de <i>Mycobacterium</i>	40	100

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
<i>paratuberculosis</i>		
Prueba intradérmica de Johnina	54	79
Inmunodifusión en agar para <i>M. paratuberculosis</i>	55	56

a) Tomado de Salman y de Thrusfield (1997).

SENSIBILIDAD INMUNOLÓGICA DE ALGUNAS PRUEBAS

Dos características inmunológicas de las pruebas de diagnóstico, son la sensibilidad y la especificidad.

- La sensibilidad inmunológica se define como la capacidad que tiene la prueba de reconocer diferentes concentraciones de anticuerpos como se observa en el Cuadro 1. Una prueba de elevada sensibilidad detecta niveles muy bajos de anticuerpos y una de baja sensibilidad sólo reconoce una gran concentración. Es posible aumentar la sensibilidad, al convertir una prueba de precipitación que es menos sensible a una de aglutinación; esto se obtiene al unir el antígeno soluble a una partícula insoluble, como a un glóbulo rojo o partículas de látex; entonces se necesitan menos moléculas de anticuerpos para desarrollar una reacción visible.
- La especificidad inmunológica es la capacidad de la prueba para detectar anticuerpos específicos contra un antígeno y no contra otro. La especificidad en parte está dada por la pureza del antígeno; es decir, entre más puro, la prueba puede ser más específica.

En la práctica se observa que cuando no se tienen antígenos altamente purificados, como ocurre con los extractos crudos de parásitos, cuanto más sensible es la prueba, resulta menos específica. Por el contrario, la prueba cuanto menos sensible, tiende a ser más espe-

cífica, o sea que tiene menos reacciones cruzadas.

Actualmente se ha incrementado considerablemente la sensibilidad manteniendo la especificidad, con las pruebas que utilizan antígenos purificados o con los sistemas de ELISA competitivos.

Cuadro 1. Sensibilidad inmunológica de algunas pruebas

Técnicas	Sensibilidad aproximada/ml
Difusión doble en agar	1 - 4 mg
Precipitación en tubo capilar	1.0 mg
Inmunodifusión radial	0.03 mg
Contrainmuno-electroforesis	0.1 mg
Aglutinación	1 µg
Fijación del complemento	1 µg
ELISA	< 1 µg
Radioinmunoanálisis	< 1 pg
Neutralización viral	0.00005 mg

CONCORDANCIA ENTRE DOS PRUEBAS (KAPPA)

Para determinar el grado de concordancia entre dos pruebas serológicas se puede utilizar la prueba de kappa que toma en consideración la concordancia al azar. Por ejemplo en el diagnóstico de la Leucosis bovina, se determinó la concordancia entre la prueba de inmunodifusión en agar (IDG) y ELISA. Se muestrearon 401 bovinos y en una tabla de 2 X 2 se anotaron los resultados:

IDG	ELISA		Total
	(+)	(-)	
(+)	88	14	102
(-)	63	236	299
Total	151	250	401

Kappa = $\frac{\text{Número de acuerdos encontrados} - \text{Número de acuerdos por azar}}{\text{Número de acuerdos por azar}}$

Total de examinados - Número
de acuerdos por azar

IDG	ELISA		Total
	(+)	(-)	
(+)	151 $\times 151/401$ $= 56.9$		
(-)		$250 \times 250/401$ $= 155.9$	
Total			401

$$\text{Kappa} = [(88+236) = 324] - [56.9 + 155.9 = 212.7] / 401 - 212.7 =$$

$$324 - 212.7 / 401 - 212.7 = 111.3 / 188.3 = 0.59$$

La interpretación fue que la concordancia o kappa entre las dos pruebas fue de 0.59 que es buena. Se observó que la prueba de ELISA fue más sensible que la IDG, pero se tendría que definir si se trata de falsos positivos ya que ésta es la oficial.

Valor de Kappa	Acuerdo
Menos de 0	ninguno
0.00 - 0.20	mínimo
0.21 - 0.40	regular
0.41 - 0.60	bueno
0.61 - 0.80	excelente
0.81 - 1.00	casi perfecto

REFERENCIAS

- Morilla, A. Introducción a las pruebas de inmunodiagnóstico. En, Manual de Inmunología. Editado por A. Morilla y C.R. Bautista. Editorial Diana, 1986, México,.
- Salman, M. Propiedades de las pruebas diagnósticas. Colorado State University Serological Epidemiology. Editado por J.R. Paul y C. White. Academic Press, New York, 1973.
- Thrusfield, M. Veterinary Epidemiology. Blackwell Science, 1997. UK.

PRUEBAS DE INMUNODIAGNÓSTICO COMERCIALES

Compañías que producen antígenos y pruebas de diagnóstico

- Agencia de Energía Atómica FAO/IAEA
- Bommeli Laboratories, Suiza
- Cambridge Veterinary Sciences, INNOVET, E.U.A.
- Centaur, E.U.A
- CENSA, Cuba
- Ciprolab, México
- HIPRA, España
- IASA. Investigación Aplicada, S.A. de C.V. México.
- ID-DLO, Institute for Animal Science and Health, Lelystad, Holanda
- IDEXX, Labs., E.U.A.
- INGENASA. Inmunología y Genética Aplicada, S.A., España.
- INIFAP, SAGAR, México
- INNOVET, E.U.A.
- KPL. Kirkegaard & Perry Laboratories, E.U.A.
- Laboratorios Baer, México
- LMD Laboratories, Inc., U.S.A.
- On Site ®
- Pourquoi Institut, Francia.
- PRONABIVE, México. Productora Nacional de Biólogos Veterinarios, México
- Rhone Merieux, Francia
- SPAFAS, E.U.A.
- SVANOVA Biotech, Suecia
- VMRD, Inc., E.U.A
- Vector, California, E.U.A.

AVES

Anemia Infecciosa de las aves	
<ul style="list-style-type: none"> • CIVTEST CAV. Labs, HIPRA, España • PROFLOK CAV, KPL, E.U.A. 	ELISA indirecta Anticuerpos en suero y yema.

Bronquitis infecciosa	
<ul style="list-style-type: none"> • PROFLOK IBV, KPL, E.U.A. • Infectious Bronchitis Virus Antibody Test Kit (IDEXX) • CIVTEST IBV. Labs, HIPRA, España • Svanovir IBV-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia. 	ELISA competitiva
<ul style="list-style-type: none"> • Bronquitis infecciosa. SPAFAS, E.U.A. 	Antígeno

Encefalomiелitis aviar	
<ul style="list-style-type: none"> • PROFLOK AE, KPL, E.U.A. • Avian Encephalomyelitis Antibody Test Kit (IDEXX) 	ELISA
<ul style="list-style-type: none"> • Encefalomiелitis aviar. SPAFAS, E.U.A. 	Antígeno

Enfermedad de la Bolsa de Fabricio o Gumboro	
<ul style="list-style-type: none"> • PROFLOK IBD, KPL, E.U.A. • Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit (IDEXX), E.U.A. • CIVTEST IBD. Labs, HIPRA, España. 	ELISA. Anticuerpos en suero y yema

Enfermedad de la Bolsa de Fabricio o Gumboro	
<ul style="list-style-type: none"> • Infección de la Bolsa de Fabricio, IASA, México • Infección de la Bolsa de Fabricio. SPAFAS, E.U.A. 	Antígeno

Enfermedad de Marek	
<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad de Marek. SPAFAS, E.U.A. 	Antígeno

Hepatitis por cuerpos de inclusión	
<ul style="list-style-type: none"> • Adenovirus aviar. SPAFAS, E.U.A. 	Inmunodifusión

Influenza aviar	
<ul style="list-style-type: none"> • PROFLOK IA, KPL, E.U.A. 	ELISA
<ul style="list-style-type: none"> • Difusión doble en agar (INIFAP) 	El antígeno es la nucleoproteína del virus A. Reconoce los anticuerpos inducidos por el virus del grupo A. No reconoce a los subtipos
<ul style="list-style-type: none"> • Influenza aviar. SPAFAS, E.U.A. 	Antígeno

Laringotraqueitis infecciosa (ILT)	
<ul style="list-style-type: none"> • PROFLOK ILT, KPL, E.U.A. 	ELISA
<ul style="list-style-type: none"> • Laringotraqueitis aviar. IASA, México • Laringotraqueitis aviar. SPAFAS, E.U.A. 	Antígeno

Leucosis aviar	
<ul style="list-style-type: none"> • PROFLOK ALV, KPL, E.U.A. • Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit (IDEXX), E.U.A. 	Antígenos

Leucosis aviar	
<ul style="list-style-type: none"> • Avian Leukosis Antibody Test Kit (IDEXX), E.U.A. 	

<i>Mycoplasma gallisepticum</i> y <i>M. synoviae</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • PROFLOK Ms, KPL, E.U.A. • SVANOVIR MS-Ab. <i>Mycoplasma synoviae</i> SVANOVA Biotech, Suecia 	ELISA competitiva
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Mycoplasma synoviae</i> DNA test (IDEXX), E.U.A. 	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Mycoplasma gallisepticum</i> DNA test (IDEXX), E.U.A. 	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Mycoplasma gallisepticum-synoviae</i> Antibody test kit (IDEXX), E.U.A. 	
<ul style="list-style-type: none"> • PROFLOK Mg, KPL, E.U.A. • <i>Mycoplasma gallisepticum</i> Antibody test kit (IDEXX), E.U.A. • SVANOVIR MG-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia 	ELISA competitiva
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Mycoplasma gallisepticum</i>. SPAFAS, E.U.A. 	Antígeno
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Mycoplasma sinoviae</i>. SPAFAS, E.U.A. 	Antígeno

Newcastle	
<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad de Newcastle, IASA, México • Enfermedad de Newcastle. SPAFAS, E.U.A. 	Antígeno

Newcastle	
<ul style="list-style-type: none"> • PROFLOK NDV, KPL, E.U.A. • Newcastle Disease antibody Test Kit (IDEXX), E.U.A. • CIVTEST NDV. Labs, HIPRA, España. • SVANOVIR NDV-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia 	ELISA indirecta

<i>Pasteurella multocida</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • PROFLOK PM, KPL, E.U.A. • Pasteurella multocida Antibody test Kit (IDEXX), E.U.A. 	

Pneumovirus aviar o Virus de la Rinotraqueitis de los pavos (TRT)	
<ul style="list-style-type: none"> • SVANOVIR APV (TRT)-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia 	ELISA competitiva.

Pulorosis	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. pullorum</i> 	Aglutinación con antígeno K polivalente

Reovirus aviar	
<ul style="list-style-type: none"> • PROFLOK REO, KPL, E.U.A. • Avian Reovirus Antibody Test Kit (IDEXX), E.U.A. • ELISA, C-Kore CENSA, Cuba • UMELISA, C-Kore CENSA, Cuba 	ELISA
<ul style="list-style-type: none"> • CIVTEST Reovirus. Labs, HIPRA, España. 	ELISA indirecta. Detecta anticuerpos en el suero y yema

Reovirus aviar	
<ul style="list-style-type: none"> • Reovirus aviar, IASA, México • Reovirus aviar, SPAFAS, E.U.A. 	Antígeno

Rinotraqueitis aviar	
<ul style="list-style-type: none"> • Pathasure Avian Rhinotracheitis. IN-NOVET, E.U.A. • CIVTEST TRT. HIPRA, España. 	ELISA indirecta

Rotavirus aviar	
<ul style="list-style-type: none"> • Rotavirus aviar. SPAFAS, E.U.A. 	Antígeno

<i>Salmonella enteritidis</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • CIVTEST Enteritidis. HIPRA, España. 	ELISA indirecta. Detecta anticuerpos en el suero y yema

Síndrome de la baja de postura (EDS)	
<ul style="list-style-type: none"> • CIVTEST EDS-76. HIPRA, España. 	ELISA indirecta. Detecta anticuerpos en el suero y yema
	Inhibición de la hemaglutinación

Tifosis aviar	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. gallinarum</i> 	Aglutinación con antígeno K polivalente

Tuberculosis	
<ul style="list-style-type: none"> • Tuberculina aviar. PRONAVIBE, México 	Intradermorreacción con tuberculina aviar

Virus de la Reticuloendoteliosis	
• Reticuloendoteliosis Virus Antibody Test Kit (IDEXX), E.U.A.	
• Reticuloendoteliosis. SPAFAS, E.U.A.	

Viruela aviar	
• Viruela aviar, IASA, México	Antígeno
• Viruela aviar. SPAFAS, E.U.A.	

PAVOS

Enfermedad de Newcastle	
• PROFLOK NDV, KPL, E.U.A.	
• Newcastle Disease antibody Test Kit (IDEXX), E.U.A.	

<i>Pasteurella multocida</i>	
• <i>Pasteurella multocida</i> Antibody test Kit (IDEXX), E.U.A.	

<i>Mycoplasma meleagridis</i>, <i>M. gallisepticum</i>, <i>M. synoviae</i>	
• <i>Mycoplasma gallisepticum</i> (Mg-T), KPL, E.U.A.	
• <i>Mycoplasma gallisepticum</i> S4229 antigen (Anatidae) <i>Mycoplasma gallisepticum</i> S6 antigen. SANOFI Diagnostics Pasteur	Aglutinación en placa
• <i>Mycoplasma meleagridis</i> (Mn-T) KPL, E.U.A.	

<i>Mycoplasma meleagridis</i>, <i>M. gallisepticum</i>, <i>M. synoviae</i>	
• <i>Mycoplasma meleagridis</i> SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia	Aglutinación en placa
• <i>Mycoplasma synoviae</i> (Ms-T) KPL, E.U.A.	
• <i>Mycoplasma synoviae</i> antigen SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia	Aglutinación en placa

Bordetelosis de los pavos	
• Bordetella avium (BA-T) KPL, E.U.A.	

<i>Salmonella enteritidis</i>	
• <i>Salmonella enteritidis</i> ELISA, IDEXX, E.U.A.	Prueba competitiva, Ag m flagellin. Prueba de escrutinio para <i>S. enteritidis</i>
• IDEXX SE ELISA, E.U.A.	

Clamidiasis	
CIVTEST Chlamidia psittaci. Labs Hipra, España	

BOVINOS

Anaplasmosis	
• Anaplasma marginales C-Kure, CENSA, Cuba	Prueba de tarjeta

Babesiosis (<i>Babesia bovis</i> <i>B. bigemina</i>)	
• <i>Babesia bovis</i> C-Kure, CENSA, Cuba	IFD
• <i>Babesia bigemina</i> C-Kure, CENSA, Cuba	IFD

Babesiosis (<i>Babesia bovis B. bigemina</i>)	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. bovis</i> ELISA. Agencia de Energía Atómica FAO/IAEA 	ELISA indirecta. El antígeno es un lisado de eritrocitos infectados con <i>B. bovis</i> libre de oxihemoglobina
<ul style="list-style-type: none"> • PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). INIFAP, México. 	Detecta el parásito
<ul style="list-style-type: none"> • Inmunofluorescencia indirecta 	Se utiliza para titular anticuerpos en el suero. El antígeno son glóbulos rojos parasitados con la babesia. Es muy sensible

Brucelosis	
<ul style="list-style-type: none"> • Antígeno buferado en rosa de Bengala PRONABIVE, México • Rose Bengal Antigen, Pourquier Institut, Francia • Bengatest, Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics, Pasteur, Francia 	
<ul style="list-style-type: none"> • Prueba de anillo en leche. PRONABIVE, México • Milk Ring Test, Pourquier Institut, Francia • Anotest, Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics, Pasteur, Francia 	Anticuerpos en leche

Brucelosis	
<ul style="list-style-type: none"> • Aglutinación lenta en tubo. Diagnóstico de Wright. PRONABIVE, México • Brucella-Ab, Svanovir Diagnostics, Suecia. • Sero-agglutination test antigen, Pourquier Institut, Francia • Antigene, Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics, Pasteur, Francia 	Anticuerpos en suero

Brucelosis (continuación)	
<ul style="list-style-type: none"> • Fijación del complemento. PRONABIVE, México • Complement fixation test antigen, Pourquier Institut, Francia • Antifix, Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics, Pasteur, Francia 	Anticuerpos en suero
<ul style="list-style-type: none"> • INGEZIM BRUCELA, Ingenasa, España • SERELISA, Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics, Pasteur, Francia • Brucella abortus, Labs. Bommeli, Suiza • SVANOVIR BRUCELLA-Ab. (C-ELISA) SVANOVA Biotech, Suecia • Brucella abortus ELISA test for serum, Pourquier Institut, Francia • Brucella abortus ELISA test for milk, Pourquier Institut, Francia • ELISA, Agencia de Energía Atómica FAO/IAEA 	ELISA indirecta para detectar anticuerpos en leche y suero. las placas contienen antígeno inactivado de <i>B. abortus</i> El antígeno es LPS como un extracto de agua caliente/fenol de <i>B. abortus</i> B99

Brucelosis (continuación)	
<ul style="list-style-type: none"> • AgriChek ® Brucella abortus antibody test PCFIA brucellosis (IDEXX), E.U.A. 	Particle Concentration Fluorescence Immunoassay System
<ul style="list-style-type: none"> • Brucella abortus antibody test CITE Brucellosis (IDEXX), E.U.A. 	Inmunoensayo de fase sólida Prueba suplementaria para la campaña
<ul style="list-style-type: none"> • Milk Brucellosis ELISA (IDEXX), E.U.A. • Lactelisa, Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics, Pasteur, Francia 	Prueba en leche
<ul style="list-style-type: none"> • Brucellergene OCB, Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics, Pasteur, Francia 	Prueba de Brucelina por intradermoreacción

Criptosporidiosis	
•	
<ul style="list-style-type: none"> • Inmunofluorescencia directa. Monofluo ® Kit. SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia 	Antisuero marcado para reconocer al parásito Para reconocer al parásito en las heces
<ul style="list-style-type: none"> • CIVTEST Cryptosporidium. HIPRA, España • Pathasure Cryptosporidium Cambridge Veterinary Sciences, INNOVET, E.U.A. 	Detección de antígeno en heces

E. coli, Rotavirus y Coronavirus	
<ul style="list-style-type: none"> • Pathasure Bovine enteritis. Cambridge Veterinary Sciences, INNOVET, E.U.A. 	Detecta tres patógenos intestinales en las heces

E. coli, Rotavirus y Coronavirus	
<ul style="list-style-type: none"> • Coronavirus - SVANOVIR BCV-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia 	ELISA indirecta para detectar anticuerpos en leche y suero. las placas contienen antígeno viral y antígeno control.
<ul style="list-style-type: none"> • INGEZIM Rotavirus, Ingenasa, España 	ELISA indirecta para detectar anticuerpos
<ul style="list-style-type: none"> • PATHFINDER ® ROTAVIRUS. SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia 	Detección de antígeno.
<ul style="list-style-type: none"> • PASTOREX ® ROTAVIRUS. SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia 	Detección de antígeno por prueba de aglutinación de látex
<ul style="list-style-type: none"> • Combo Rotavirus/Coronavirus, On site® 	
<ul style="list-style-type: none"> • Rotavirus becerros, On site® 	
<ul style="list-style-type: none"> • CIVTEST Rotavirus. HIPRA, España. 	Detección de rotavirus en las heces

Diarrea viral bovina	
<ul style="list-style-type: none"> • Pestivirus antigen detection kit. Moredun Diagnostics, SVANOVA Biotech, Suecia 	<p>Detecta el virus en la sangre. Utiliza anticuerpos monoclonales que reconocen los epitopos conservados NS2-3 de los polipéptidos no estructurales que se encuentran sólo en las células infectadas con los pestivirus (Diarrea viral Bovina y Enfermedad de la Frontera de los ovinos)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • CEDITEST BVDV-Ab, id-dlo, Lelystad Holanda • INGEZIM BVD, Ingenasa, España 	<p>ELISA competitivo</p>
<ul style="list-style-type: none"> • BVD, Labs. Bommeli, Suiza • SVANOVIR BVDV-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia 	<p>ELISA indirecta para detectar anticuerpos en leche y suero. las placas contienen antígeno viral y antígeno control.</p>

Fasciolasis bovina	
<ul style="list-style-type: none"> • ELISA serum test (verification) Pourquier Institut, Francia • ELISA milk test (verification) Pourquier Institut, Francia 	<p>ELISA indirecto para detectar anticuerpos en suero o en leche</p>

Hypoderma bovis	
<ul style="list-style-type: none"> • ELISA serum test (Screening). Pourquier Institut, Francia • ELISA serum test (Verification). Pourquier Institut, Francia 	

Leptospirosis	
<ul style="list-style-type: none"> • CEDITEST Leptospira hardjo, id-dlo, Lelystad, Holanda 	<p>ELISA competitivo</p>
<ul style="list-style-type: none"> • EIA Leptospira, Ingenasa, España 	<p>ELISA indirecto</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Aglutinación microscópica 	<p>El antígeno son las diferentes serovarietades. Se detectan anticuerpos</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Prueba de aglutinación, Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics, Pasteur, Francia 	<p>Antígeno termorresistente</p>

Leucosis bovina	
<ul style="list-style-type: none"> • Leucose bovine AGID. Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia • Leukassay B. Producido por Rhone Merieux, Inc, Athens, Georgia, E.U.A y distribuido por Pitman Moore, Inc, Mundelein, Illinois, E.U.A. • Agar gel immunodiffusion test, Instituto Pourquier, Francia 	<p>Prueba de inmunodifusión en agar. El antígeno es la glicoproteína gp 51</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Bovine Leukosis Antibody Test ELISA (IDEXX), E.U.A. • Leucosis bovina, Labs. Bommeli, Suiza • SVANOVIR BLV-gp51. SVANOVA Biotech, Suecia 	<p>ELISA indirecta para detectar anticuerpos en leche y suero. Las placas contienen antígeno viral y antígeno control. El antígeno es la glicoproteína del virus.</p>

Leucosis bovina	
<ul style="list-style-type: none"> • INGEZIM BLV COMPAC, Ingenasa, España • SERELISA BLV Ab Mono blocking. Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia • Leukosis Indirect ELISA kit. Agencia Internacional de Energía Atómica, FAO/IAEA • ELISA serum test (screening), Pourquier Institut Francia • ELISA serum test (verification), Pourquier Institut Francia • ELISA milk test (screening), Pourquier Institut Francia • ELISA milk test (verification), Pourquier Institut Francia 	<p>ELISA competitiva para anticuerpos en suero</p> <p>Antígeno viral crudo preparado en células renales de ovino (FLK) infectadas persistentemente con virus de la leucemia bovina.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • SERELISA BLV Ab Mono indirect. Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia • SERELISA BLV Bi indirect. Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia 	<p>ELISA indirecta para anticuerpos en suero.</p> <p>ELISA indirecta de doble pozo para confirmar anticuerpos en el suero</p>

Leucosis bovina	
<ul style="list-style-type: none"> • LACTELISA BLV Ab Mono Indirect. Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia. • LACTELISA BLV Ab Bi indirect. Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia 	<p>ELISA indirecta para anticuerpos en leche.</p> <p>ELISA indirecta de doble pozo para confirmar anticuerpos en el leche.</p>

Neospora caninum

Neospora caninum, IDEXX

Parainfluenza-3

<ul style="list-style-type: none"> • SVANOVIR PIV3-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia • C-Kure, CENSA, Cuba (IP) • C-Kure, CENSA, Cuba (IFD) 	<p>ELISA indirecta para detectar anticuerpos en el suero y la leche.</p>
--	--

Paratuberculosis

<ul style="list-style-type: none"> • Intradermorreacción 	<p>Johnina. Prueba de inmunidad celular</p>
<ul style="list-style-type: none"> • M. pt Antibody ELISA, IDEXX, EUA • ELISA serum test (verification), Pourquier Institut, Francia 	<p>Detecta anticuerpos en el suero</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Parafix, Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics, Pasteur, Francia 	<p>Fijación del complemento</p>

Paratuberculosis		Rinotraqueítis infecciosa bovina	
<ul style="list-style-type: none"> • M. pt. γ - Interferon ELISA, IDEXX, EUA 	<p>Detecta interferón gama como correlación de inmunidad celular al detectar linfocitos circulantes sensibilizados con <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> y que liberan interferón gama en presencia de antígeno específico</p>	<ul style="list-style-type: none"> • INGEZIM IBR, Ingenasa, España • Infectious Bovine Rhinotracheitis test IDEXX, EUA • IBR, Labs. Bommeli, Suiza • ELISA IBR-IPV Serum test (screening) Pourquoier Institut, Francia • ELISA IBR-IPV Serum test (verification) Pourquoier Institut, Francia • ELISA competition serum "gB blocking" Pourquoier Institut, Francia • ELISA IBR-IPV milk test (screening) Pourquoier Institut, Francia • ELISA IBR-IPV Serum milk (verification) Pourquoier Institut, Francia • SVANOVIR IBR-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia. • CIVTEST IBR. HIPRA, España 	<p>ELISA indirecta para detectar anticuerpos en leche y suero</p>
<ul style="list-style-type: none"> • M. pt DNA probe Test PCR para detectar ADN, IDEXX, EUA 	<p>A partir de heces se puede detectar la presencia de la bacteria. Los iniciadores detectan el ADN de <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> y el ADN amplificado por medio de un nucleótido complementario marcado con una enzima; se forma una mancha en la membrana de nylon</p>		
Toxoplasmosis			
	<ul style="list-style-type: none"> • Inmunofluorescencia indirecta. Monofluo ® Kit SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia 		<p>Detecta <i>T. gondii</i> por inmunofluorescencia indirecta</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Prueba de aglutinación en látex. Pastorex Tox. SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia 		<p>El antígeno son partículas de látex sensibilizadas</p>

Tuberculosis	
<ul style="list-style-type: none"> • Boviter PPD, Tuberculine forte. Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics, Pasteur, Francia • PPD bovino PRONABIVE, México 	<p>Tuberculina bovina para intradermoreacción.</p> <p>Detecta inmunidad celular</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Avituber. Rhone Merieux, SANOFI Diagnostics, Pasteur, Francia- • PPD aviar PRONABIVE, México 	<p>Tuberculina aviar</p>
<ul style="list-style-type: none"> • BOVIGAM, Ingenasa, España • M. bovis γ - interferon ELISA, Labs. IDEXX, EUA 	<p>Detecta interferón gama como correlación de inmunidad celular al detectar linfocitos circulantes sensibilizados con <i>Mycobacterium bovis</i> y que liberan interferón gama en presencia de PPD</p>

Virus respiratorio sincitial bovino	
<ul style="list-style-type: none"> • INGEZIM BRSV, Ingenasa, España • CIVTEST BRSV/VRS. Labs, HIPRA, España • SVANOVIR RSV-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia 	<p>ELISA indirecto para detectar anticuerpos en leche y suero. las placas contienen antígeno viral y antígeno control.</p>

Virus respiratorio sincitial bovino	
<ul style="list-style-type: none"> • PATHFINDER ® RSV. SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia. 	<p>Detección de antígeno por prueba de EIA en tubo</p>
<ul style="list-style-type: none"> • MONFLUO ® SCREEN RSV, SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia 	<p>Detección de antígeno por prueba de aglutinación de látex</p>

OVINOS Y CABRAS

Artritis Caprina	
<ul style="list-style-type: none"> • IDG P28, Pourquier Institut, Francia 	<p>Antígeno para inmunodifusión en agar</p>
<ul style="list-style-type: none"> • ELISA CAEV, Pourquier Institut, Francia • Artritis caprina, Labs. Bommeli, Suiza 	<p>ELISA indirecta</p>

Clamidirosis	
<ul style="list-style-type: none"> • CIVTEST Chlamidia psittaci, HIPRA, España. 	

Criptosporidium	
<ul style="list-style-type: none"> • CIVTEST Criptosporidium, HIPRA, España 	

Enfermedad de la Frontera	
<ul style="list-style-type: none"> • SVANOVIR BDV-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia 	<p>ELISA indirecta para detectar anticuerpos en leche y suero. las placas contienen antígeno inactivado del virus de la Enfermedad de la Frontera.</p>

Enfermedad de la Frontera	
<ul style="list-style-type: none"> • Pestivirus antigen detection kit. Moredun Diagnostics, SVANOVA Biotech, Suecia 	Detecta el virus en la sangre. Utiliza anticuerpos monoclonales que reconocen los epitopos conservados de 125K/80K de los polipéptidos no estructurales que se encuentran sólo en los pestivirus (Diarrea viral Bovina y Enfermedad de la Frontera de los ovinos)

Maedi-Visna	
<ul style="list-style-type: none"> • IDG GP135, Pourquier Institut, Francia 	Antígeno para inmunodifusión en agar
<ul style="list-style-type: none"> • ELISA MAEDI-VISNA test, Pourquier Institut, Francia 	ELISA indirecta

<i>Mycoplasma agalactie</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Labs. Bommeli, Suiza • CIVTEST <i>Mycoplasma agalactiae</i>. Hipra, España 	

Rotavirus	
<ul style="list-style-type: none"> • CIVTEST Rotavirus, HIPRA, España 	

EQUINOS

Anemia Infecciosa equina	
<ul style="list-style-type: none"> • Inmunodifusión en agar (AGID) IDEXX, USA. • LAB-EZ/EIA • VMRD, Inc., USA. 	Prueba de Coggins de inmunodifusión en agar con antígeno altamente purificado o recombinante

Anemia Infecciosa equina	
<ul style="list-style-type: none"> • Anemia Infecciosa Equina. Centaur, E.U.A. 	ELISA indirecto para detectar anticuerpos
<ul style="list-style-type: none"> • C-ELISA (IDEXX). ELISA TECHNOLOGIES, USA. 	Antígeno purificado del virus de AIE. ELISA competitiva con el monoclonal contra p26

PORCINOS

ENFERMEDAD DE AUJESZKY	
<ul style="list-style-type: none"> • ELISA escrutinio Screening, IDEXX, EUA • Aujeszky, test. Bommeli, Suiza • CIVTEST ADV. HIPRA, España • SERELISA PRV Total Ab, Rhone Merieux, Francia 	Virus completo Detecta anticuerpos contra virus vacunal y virus de campo
<ul style="list-style-type: none"> • PCFIA PRV Screen, IDEXX, EUA 	Particle concentration Fluorescence Immunoassay Technology. Sistema automático para procesar hasta 800 muestras simultáneamente
<ul style="list-style-type: none"> • ELISA competitiva gE (gI), IDEXX, EUA • PRV-ab, gI, Bommeli, Suiza • CIVTEST ADV (gE), HIPRA, España • ELISA Serum test gE (Screening) Pourquier Institut, Francia • SVANOVIR PRV-gI-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia 	Virus completo Reconoce anticuerpos contra gE (gI) del virus de campo. No reconoce anticuerpos vacunales inducidos por vacunas gE- (gI-) El antígeno son glicoproteínas del virus adheridas al pozo.

ENFERMEDAD DE AUJESZKY	
• PCFIA PRV gI, IDEXX, EUA	Particle concentration Fluorescence Immunoassay Technology. Sistema automático para procesar hasta 800 muestras simultáneamente
• SVANOVIR PRV-gII-Ab. SVANOVA Biotech, Suecia	ELISA competitiva que detecta anticuerpos contra la glicoproteína II (gII). Discrimina animales vacunados de los no vacunados.
• ELISA competitiva gpX, IDEXX, EUA	ELISA competitiva que detecta anticuerpos contra la glicoproteína X (gX). Discrimina animales vacunados de los no vacunados.
• ELISA de verificación, IDEXX, EUA	Los pozos contienen virus completo y otros sólo sobrenadante de cultivos celulares para determinar posibles reacciones cruzadas.
• Aglutinación de partículas de látex	Virus completo. Detecta anticuerpos contra virus vacunal y virus de campo
• Inmunoperoxidasa, PRONABIVE, México	Virus completo mantenido en cultivos celulares. Detecta anticuerpos contra el virus vacunal y el de campo

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	
• Aglutinación en tarjeta, Pleurotest, Labs. Ciprolab, México	Antígeno acidificado de los serotipos 1, 3, 5 y 7. Reconoce anticuerpos aglutinantes de alta afinidad. No reconoce anticuerpos vacunales
• ELISA, Bommeli, Suiza	Antígeno de los serotipos 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11

Brucelosis	
• Antígeno de Rosa de Bengala	Bacteria completa. Prueba de piara, no individual. Cruza con <i>Yersinia enterocolitica</i>

Cisticercosis	
Western blot. Laboratorios Baer, México.	Immunoelctrotransferencia para detección de antígenos
Taenia solium Screening test. LMD Laboratories, Inc., U.S.A.	ELISA indirecta para el diagnóstico en humanos

Criptosporidium	
• CIVTEST Criptosporidium. HIPRA, España	Detecta el Criptosporidium en heces

Enteritis proliferativa o Ileitis	
• PCR (Reacción en cadena de la polimerasa utilizando sondas específicas)	A partir de heces. Detecta <i>Lawsonia intracellularis</i>

<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (Erisipela porcina)	
<ul style="list-style-type: none"> • CIVTEST SE/MR, HIPRA, España • Ingezim Mal Rojo. Ingenasa, España 	<p>Detecta anticuerpos séricos contra <i>E. rhusiopathiae</i> vacunales o de campo.</p>

Fiebre Porcina Clásica- Cólera porcino	
<ul style="list-style-type: none"> • Ceditest ELISA, ID-DLO, Lelystad, Holanda 	<p>Baculovirus inactivado con Aziridine al que se le insertó el gen del epitopo E1 del virus. Prueba de captura y competitiva que utiliza el monoclonal 3 y 8 contra el epitopo E1. Reconoce anticuerpos. No contiene virus infeccioso de FPC.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • ELISA^{tns} competitiva Porcilis® Pesti, Bommeli, Suiza 	<p>Cuando se utiliza el kit con suero de animales vacunados con la vacuna Porcilis® Pesti, INTERVET, diferencia anticuerpos vacunales de los de campo.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • SERELISA HCV Ab ELISA competitiva Rhone Merieux, Francia. (Sanofi Diagnostics, Pasteur, Francia) • Fiebre Porcina Clásica, Bommeli, Suiza • CIVTEST HC/PPC, HIPRA, España 	<p>Prueba competitiva. Los pozos de la placa están sensibilizados con el antígeno P120, se adiciona el suero problema, se lava y se adiciona un anticuerpo monoclonal anti P120 conjugado con peroxidasa, se lava y se adiciona el sustrato Los anticuerpos anti P120 cruzan con el virus de la Diarrea Viral Bovina.</p>

Fiebre Porcina Clásica- Cólera porcino	
<ul style="list-style-type: none"> • Inmunoperoxidasa. PRONABIVE, México) 	<p>Virus completo mantenido en cultivos celulares. Detecta anticuerpos contra virus vacunal y virus de campo. Cruza con el virus de la Diarrea Viral Bovina</p>
<ul style="list-style-type: none"> • SERELISA HCV Ag ELISA de captura. (Labs. Rhone Merieux, Francia) 	<p>Los pozos de la placa están cubiertos con anticuerpos de captura contra el virus de FPC. Se utiliza para detectar virus circulante.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Avidina Biotina-fosfatasa alcalina (ABC-AP), Vector (California, E.U) y Plum Island, E.U. (monoclonal y conjugado) 	<p>Para detectar el virus en los tejidos, de 8 a 10 veces más sensible que inmunofluorescencia</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Inmunofluorescencia directa (INIFAP, Mexico). 	<p>Virus en los tejidos. Se utiliza para el diagnóstico de la enfermedad</p>

Gastroenteritis Transmisible de los Cerdos/Coronavirus Respiratorio de los Cerdos	
<ul style="list-style-type: none"> • ELISA SVANOVIR TGEV/PRCV-Ab.SVANOVA Biotech, Suecia • INGEZIM TGEV COMPAC; Ingenasa, España 	<p>ELISA competitiva que utiliza monoclonales contra GTC y CRP. Diferencia infecciones entre cada uno de los virus</p>

Influenza porcina	
• Inmunodifusión en agar INIFAP, México	Nucleocápside de virus de influenza del grupo A. Detecta anticuerpos en el suero por infecciones por virus de influenza grupo A
• CIVTEST Influenza. HIPRA, España	ELISA indirecta. Detecta anticuerpos en el suero.

Mycoplasma hyopneumoniae	
• ELISA. Bommeli, Suiza	Antígeno purificado. Prueba indirecta

Parvovirus	
• Parvovirus, ELISA, Ingenasa, España	ELISA indirecto
• CEDITEST ELISA para PPV-Ab; ID-DLO, Lelystad, Holanda	
• Inhibición de la hemaglutinación	Virus atenuado mantenido en cultivos celulares. A partir de títulos de 1:240 reconoce anticuerpos inducidos por infecciones de campo

Síndrome Disgenésico Respiratorio del Cerdo (PRRS)	
• IPMA	Sólo detecta anticuerpos contra una cepa
• IFA	Sólo detecta anticuerpos contra una cepa
• SN	Sólo detecta anticuerpos contra una cepa
• Ingezim PRRS COMPAC; Ingenasa, España	ELISA competitiva

Síndrome Disgenésico Respiratorio del Cerdo (PRRS)	
• Ingezim PRRS Screening; Ingenasa, España	ELISA indirecta para cepas americanas o europeas.
• Herdcheck, PRRS, IDEXX, EUA	Reconoce anticuerpos contra cepas norteamericanas y la europea.

Rotavirus	
• Rotaforesis	A partir de heces. Separa los 11 segmentos de ARN doble cadena. Se puede determinar a que subgrupo pertenece
• Rotavirus On Site ®	
• INGEZIM Rotavirus, Ingenasa, España	Detecta anticuerpos contra el Rotavirus grupo A
• CIVTEST Rotavirus. Labs, HIPRA, España	Detecta el antígeno en las heces
•	

Salmonelosis	
• Antígeno para aglutinación en placa. INIFAP, México	Bacterias inactivadas de <i>S. choleraesuis</i> y <i>S. typhimurium</i> . Reconoce anticuerpos contra <i>Salmonella</i> sp

Triquinelosis	
• ELISA indirecta. INIFAP-CINVESTAV, MEXICO	Utiliza antígeno purificado por columna de afinidad.

PERROS

• Equate Canine Heartworm. INNOVET, E.U.A.	
• Heartworm antigen Test Idexx, E.U.A.	
• Probe Parvo Parvovirus Test IDEXX, E.U.A.	Inmunoensayo de fase sólida
• Lyme disease test IDEXX, E.U.A.	
• T4 Test IDEXX, E.U.A.	

GATOS

Leucemia felina	
• COMBO ® Feline Leukemia Virus Antigen/Feline Immunodeficiency Virus antibody Test, IDEXX, E.U.A.	
• Snap FeLV Feline Leukemia Virus antigen Test, IDEXX, E.U.A.	Inmunoensayo de captura en fase sólida Detecta la proteína p27 específica de grupo en la sangre, plasma o suero
• Feline Leukemia Virus Saliva/tears, IDEXX, E.U.A.	

Inmunodeficiencia felina	
• Feline Immunodeficiency Virus antibody Test, IDEXX, E.U.A.	

Peritonitis infecciosa felina	
• Feline Infectious Peritonitis test, IDEXX, E.U.A.	

RABIA

Rabia	
• Conjugado fluorescente anti nucleocápside SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia	Diagnóstico de rabia en tejidos por inmunofluorescencia.
• Conjugado. INIFAP, México	
• Conjugado fluorescente anti rábico. Laboratorios Baer, México	
• PLATELIA ® RAGE. ELISA. SANOFI Diagnostics Pasteur, Francia	Detección de anticuerpos séricos contra la glicoproteína del virus rábico.
• RAGE Ag (RREID)	Rapid Rabies Enzyme Immuno Assay
• Prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (RFFITD). Laboratorios Baer, México	Detección y titulación de anticuerpos.
• Sueroneutralización. Laboratorios Baer, México	Detección y titulación de anticuerpos.

MICOTOXINAS Y OTROS COMPUESTOS

• Agri-Screen para Aflatoxina B ₁ ; NEOGEN, EUA.(Kit de Campo)	ELISA Competitiva para determinación cualitativa.
---	---

• Agri-Screen para Aflatoxina B ₁ ; NEOGEN, EUA.(Kit de Laboratorio)	ELISA Competitiva para determinación cualitativa.
• Veratox para Aflatoxinas Totales; NEOGEN. EUA.	ELISA Competitiva para determinación cuantitativa.
• Veratox para Ocratoxina; NEOGEN, EUA	ELISA Indirecta para determinación cuantitativa.
• Veratox para Zearalenona; NEOGEN, EUA	ELISA Competitiva para determinación cuantitativa.
• Veratox para Toxina T ₂ ; NEOGEN, EUA	ELISA Competitiva para determinación cuantitativa.
• Veratox para Vomitoxina; NEOGEN, EUA	ELISA Competitiva para determinación cuantitativa.
• Veratox para Fumonisina; NEOGEN, EUA	ELISA Competitiva para determinación cuantitativa.
• Aflatoxina M ₁ ; IDEXX, EUA.	ELISA
• Aflatoxina B ₁ ; IDEXX, EUA	ELISA
• Veratox para Salinomicina ; NEOGEN, EUA	ELISA Competitiva para determinación cuantitativa.
• Veratox para Histaminas ; NEOGEN, EUA	ELISA Competitiva para determinación cuantitativa.

KITS DE DOPAJE

• Caballos de carreras, ELISA TECHNOLOGIES, E.U.A.	ELISA competitiva
• Jockeys, ELISA TECHNOLOGIES, E.U.A.	ELISA competitiva
• Galgos, ELISA TECHNOLOGIES, E.U.A.	ELISA competitiva

DIRECTORIO DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO EN MÉXICO

AGROPECUARIA SANFANDILA, S.A. DE C.V.

TEL.: 01 (47) 42 33 00

FAX.: 01 (47) EXT. 162

CARR. LAGOS DE MORENO-SAN LUIS POTOSÍ, KM 12.5

LAGOS DE MORENO, JALISCO. ,C.P. 47420

BIOTECNOLOGÍA VETERINARIA DE PUEBLA, S.A. DE C.V.

TEL.: 01 (238) 221 07

FAX.: 01 (238) 221 07

LEÓN GUZMÁN No. 313, FRACC. REFORMA

TEHUACÁN, PUEBLA. C.P. 75760

CENTRO NACIONAL DE SALUD ANIMAL

TEL: 01 (593) 607 85 FAX: 01 (593) 607 79

CARR. FEDERAL MEXICO-PACHUCA KM. 37.5

SANTA ANA TECÁMAC, ESTADO DE MÉXICO. C.P. 54160

DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS VETERINARIOS, S.A. DE C.V.

TEL: 581-07-74

FAX: 698-14-66

MAÍZ No. 18-C

MÉXICO, D.F. C.P. 09810.

FORRAJERA DE GANADEROS DE

AGUASCALIENTES S.A. DE C.V.

TEL: 01 (49) 148180

FAX: 01 (49) 148965

PROLONGACIÓN ZARAGOZA No. 1604-A

AGUASCALIENTES, AGUASCALIENTES. C.P. 20280

INVESTIGACIÓN APLICADA, S.A. DE C.V.

TEL: (238) 3-00-00

FAX: (238) 3-02-14

7 NORTE No. 416

TEHUACÁN, PUEBLA. C.P. 75700

LABORATORIO CORDOBÉS DE DIAGNÓSTICO, S.A. DE C.V.

TEL.: 01 (27) 16 17 77

FAX: 01 (27) 16 18 71

AV. DE LAS QUINTAS S/N

FRACCIONAMIENTO LAS QUINTAS

CÓRDOBA, VERACRUZ. C.P. 94580

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN PECUARIA, S.A. DE C.V.

TEL.: (378) 145 30

FAX: (378) 145 40

AVICULTORES S/N

TEPATITLÁN, JALISCO. C.P. 47670

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANIMAL DEL ESTADO DE BAJA CALIFORNIA

TEL: 01 (65) 61-99-93

FAX: 01 (65) 52-32-48

KM. 1.5 CARRETERA A SAN FELIPE MEXICALI, BAJA CALIFORNIA. C.P.

21250

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANIMAL DEL ESTADO DE COLIMA

TEL: 01 (331) 228-18

FAX: 01 (331) 355-82

KM. 1.5 CARRETERA COLIMA – COQUINATLÁN

COLIMA, COLIMA. C.P. 28950.

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANIMAL DEL ESTADO DE HIDALGO

TEL: 01 (771) 806-32

FAX: 01 (771) 806-32

KM. 7.5 CARRETERA PACHUCA – TULANCINGO

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO.

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANIMAL DEL ESTADO. DE JALISCO

TEL: 01 (3) 635-22-13

FAX: 01 (3) 812-53-63

AV. REVOLUCIÓN No. 321

SECTOR REFORMA

GUADALAJARA, JALISCO. C.P. 444400

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANIMAL DEL ESTADO. DE MICHOACÁN

SUBCOMITÉ DE AVICULTURA

TEL: 01 (43) 14-21-75

FAX: 01 (43) 14-21-75

AV. ACUEDUCTO No. 1093

MORELIA, MICHOACÁN. C.P. 58240

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANI-

MAL DEL ESTADO. DE MICHOACÁN

SUBCOMITÉ DE PORCICULTURA

TEL: 01 (352) 21-599

FAX: 01 (352) 21-599

BLVD. LÁZARO CÁRDENAS No. 1329

LA PIEDAD, MICHOACÁN. C.P. 58240

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANI-

MAL DEL ESTADO. DE NUEVO LEÓN

TEL: 01 (8) 367 44 86

FAX: 01 (8) 337 56 30

TERRENOS DE LA EXPOSICIÓN GANA-

DERA KM. 4

GUADALUPE, NUEVO LEÓN. C.P. 67180

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANI-

MAL DEL ESTADO. DE PUEBLA

TEL: 01 (238) 23-139

FAX: 01 (238) 23-139

ENRIQUE S. MUNTH ESQ. MELCHOR

OCAMPO

TEHUACÁN, PUEBLA

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANI-

MAL DEL ESTADO. DE QUERÉTARO

TEL.: 01 (427) 500 80 FAX.: 01 (427) 500

80

EXPOSITOR S/N. PRADOS DEL MIRA-

DOR

QUERÉTARO, QUERÉTARO. C.P. 76070

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANI-

MAL DEL ESTADO. DE QUINTANA

ROO

TEL.: 01 (983) 224 09

FAX.: 01 (983) 524 09

PLUTARCO ELÍAS CALLES No. 210

CHETUMAL, QUINTANA ROO. C.P.

77090

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANI-

MAL DE LA REGIÓN LAGUNERA

TEL.: 01 (17) 50 01 93

FAX.: 01 (17) 50 12 25

BLVD. MIGUEL ALEMÁN Y TERRAZAS
GÓMEZ PALACIO, DURANGO. C.P.
35050

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANI-

MAL DEL ESTADO. DE SINALOA

TEL: (67) 50 29 99

FAX: (67) 50 29 99

CARRETERA INTERNACIONAL SALIDA
NORTE KM. 3.5

CULIACÁN, SINALOA. C.P. 80130

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANI-

MAL DEL ESTADO. DE TABASCO

TEL.: 01 (93) 540289

FAX.: 01 (93) 541591

AV. ADOLFO RUÍZ CORTINES No. 2223

VILLAHERMOSA, TABASCO. C.P. 76070

LABORATORIO DE PATOLOGÍA ANI-

MAL DEL ESTADO. DE YUCATÁN

TELS: (99) 431535

FAX: (99) 433451

KM. 4.5 CARRETERA MÉRIDA-MOTUL

MÉRIDA, YUCATÁN. C.P. 97430

PECUARIUS LABORATORIO, S.A. DE

C.V.

TEL: 01 (641) 320 25

FAX: 01 (461) 438 10

CARR. OBREGÓN-BACÚM KM. 1

CIUDAD OBREGÓN, SONORA. C.P.

85060

UNIÓN GANADERA REGIONAL DE

PORCICULTORES DEL ESTADO DE

GUANAJUATO

LABORATORIO DE ALIMENTOS BA-

LANCEADOS

TEL: 01 (462) 252-34

FAX: 01 (462) 252-35

AV. DOLORES HIDALGO S/N

CIUDAD INDUSTRIAL

IRAPUATO, GUANAJUATO. C.P. 36550

UNIÓN GANADERA REGIONAL DE

PORCICULTORES DEL ESTADO DE

GUANAJUATO

LABORATORIO DE SEROLOGÍA

TEL: 01 (462) 671-93

FAX: 01 (462) 671-93

MANUEL DOBLADO No. 77 SUR, ZONA
CENTRO
IRAPUATO, GUANAJUATO. C.P. 36550
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA
TEL.: 01 (65) 53 64 91
FAX.: 01 (65) 53 64 91
ÁLVARO OBREGÓN Y JULIÁN CARRI-
LLO S/N
MEXICALI, BAJA CALIFORNIA. C.P.
21250

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
DEPARTAMENTO DE AVES
TEL: 622 58 58
FAX: 622 58 67
CIUDAD UNIVERSITARIA , UNAM
FACULTAD DE MEDICINA VETERINA-
RIA Y ZOOTECNISTA
MÉXICO,D.F. C.P. 04360.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
DEPARTAMENTO DE CERDOS
TEL: 616 11 64
FAX: 616 11 64
CIUDAD UNIVERSITARIA , UNAM
FACULTAD DE MEDICINA VETERINA-
RIA Y ZOOTECNISTA
MEXICO,D.F. C.P. 04360

Desinfección y desinfectantes

I. Carolina Ramírez Casillas

Introducción

Actividad desinfectante

Algunos productos desinfectantes importantes

Procedimiento para la fumigación con formaldehído

Normas de seguridad durante el proceso de desinfección

Esterilización por calor

Lecturas recomendadas

INTRODUCCIÓN

Los agentes físicos como la humedad y el calor seco, juegan un papel primordial en la esterilización; los agentes químicos y germicidas son utilizados primordialmente como desinfectantes y antisépticos.

Los **desinfectantes** representan un grupo de agentes químicos que destruyen los microorganismos de las superficies inanimadas. El efecto puede ser inhibir el crecimiento bacteriano, con reversión del efecto cuando se retira el agente (efecto bacteriostático); o destruir el crecimiento bacteriano (efecto bactericida). Los desinfectantes están influenciados por factores como concentración, pH y tiempo de exposición.

Los **antisépticos** son compuestos químicos que destruyen o inhiben el crecimiento de los microorganismos cuando se aplican a tejidos vivos. Los antisépticos deberán tener alta toxicidad para los microorganismos y baja toxicidad para las células animales. Son sustancias que se aplican tópicamente y, como los desinfectantes, su efectividad puede

estar limitada por su concentración o método de aplicación. Los compuestos rara vez son desinfectante y antiséptico a la vez, el alcohol podría ser la excepción.

Por otro lado, los desinfectantes y antisépticos no necesariamente crean un medio ambiente estéril; la **esterilización** es un proceso en donde los microorganismos, incluyendo endosporas bacterianas altamente resistentes, son completamente destruidos. El calor húmedo con autoclave de vapores es el agente más utilizado para esterilización.

Los **limpiadores** son compuestos químicos utilizados en la limpieza de las explotaciones pecuarias, los más utilizados en la limpieza de locales y equipo son los agentes surfactantes. Existen tres tipos de agentes surfactantes:

- Aniónicos (jabón común)
- Catiónicos (jabones invertidos)
- No iónicos (povidones como la polivinilpirrolidona)

Los agentes **surfactantes aniónicos** actúan únicamente en contra de microorganismos Gram positivos, pero debido a su acción física de lavado se consideran efectivos para eliminar microorganismos transitorios, y son apreciados por su biodegradabilidad. Ejemplo: jabón duro de sosa.

Los agentes **surfactantes catiónicos** o “jabones invertidos”, poseen actividad bacteriana contra microorganismos Gram positivos y contra Gram negativos a concentraciones altas; en este grupo los cuaternarios de amonio son los ejemplos más importantes; no poseen actividad fungicida, viricida o esporicida, poseen baja toxicidad, son incompatibles con los jabones comunes y su acción detergente se potencializa en pH ácido. Ejemplo: cloruro de benzalconio.

- Los compuestos aniónicos y catiónicos se inactivan mutuamente.

Los agentes **surfactantes no iónicos (povidones)** son productos sintéticos empleados

como antisépticos en piel y mucosa oral o vaginal. Por ejemplo: *isodine*.

ACTIVIDAD DESINFECTANTE

Se han definido tres niveles de desinfección: alto, intermedio y bajo (*véase el cuadro 25 en la página 215*):

El **nivel alto de desinfección** incluye:

- 8% de solución de **formaldehído** en 70% de etanol
- 2% de glutaraldehído
- 6 a 10% de **peróxido de hidrógeno** estabilizado (agua oxigenada)
- óxido de etileno gaseoso

Estos compuestos pueden matar gran número de endoesporas bacterianas resistentes, pero puede requerirse hasta 24 horas de exposición o más. La mayoría de los desinfectantes no pueden alcanzar este nivel de actividad antimicrobiana.

En condiciones óptimas los procedimientos de desinfección de nivel alto pueden ser considerados equivalentes a la esterilización. Debido a que un gran número de utensilios utilizados en un hospital (material médico y quirúrgico) son dañados por las altas temperaturas y no pueden ser esterilizados por calor, deberán ser desinfectados con agentes químicos. En ausencia de esporas bacterianas son muy efectivos. El material tratado deberá ser profusamente enjuagado en agua estéril, secado en un gabinete especial con aire estéril y almacenado en un envase estéril.

Los **desinfectantes de nivel medio** son aquellos que no necesariamente matan a las endoesporas bacterianas, pero si inactivan al bacilo tuberculoso. Este grupo de desinfectantes también son efectivos contra hongos⁹², así como virus pequeños o medianos con cu-

bierta lipídica o sin ella. Ejemplo de desinfectantes de nivel intermedio incluyen:

- alcohol al 70 o 90%.
- compuestos **clorinados**: cloro libre, ácido hipocloroso derivado del hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio o cloro gaseoso, a 500 a 5000 mg/L.
- 1 a 3% de compuestos **fenólicos**.
- 0.5% de **yodo** en 70% de etanol.
- 1% de **yodo** acuoso.

Aunque los desinfectantes de nivel intermedio son considerados como efectivos contra virus, hay algunas excepciones, y algunos de los germicidas líquidos más ampliamente empleados no destruyen picornavirus, dentro de los cuales está el grupo de los enterovirus y el rinovirus del resfriado común.

Los **desinfectantes de nivel bajo** son los que no se puede confiar que destruyan en un período de tiempo práctico esporas bacterianas, bacilos tuberculoso o virus pequeños o medianos. Pueden ser útiles para matar rápidamente las formas vegetativas de bacterias y hongos, así como virus de tamaño medio con capa lipídica. Ejemplo:

- compuestos **cuaternarios de amonio** acuosos
- **hexaclorofeno**
- cloroóxido.

Se requieren concentraciones relativamente altas de **mercuriales** para alcanzar significativamente la actividad bactericida, no se consideran eficientes y tienen muy poco valor en las estrategias modernas de desinfección.

Los **yodóforos** a 75-150 mg/L van de bajos a intermedios en sus niveles de actividad. Sin embargo, si se incrementa la concentración de 750 a 5000 mg o más de yodo por litro, son capaces de alcanzar un nivel de desinfección alto. En el cuadro 26 (*página 216*) se presentan los desinfectantes y antisépticos más usados.

⁹² Esporas asexuadas, pero no necesariamente clamidiasporas o esporas sexuadas.

ALGUNOS PRODUCTOS DESINFECTANTES IMPORTANTES

Los **alcoholes** son solventes orgánicos que desorganizan la membrana celular, penetrando la cadena de hidrocarburos de los lípidos. Los alcoholes etílico y propílico en concentraciones de 60 al 90% se utilizan para antisepsia de las manos de los cirujanos, pero no se recomiendan para desinfección de material quirúrgico, pues no destruye esporas.

Los **aldehídos** son agentes alquilantes que modifican los grupos funcionales de las proteínas de los microorganismos. La **formalina** contiene 30 a 40 % de gas **formaldehído**, adicionado con alcohol metílico en un 15 % para evitar su polimerización y el resto de agua. El formaldehído puro es un gas soluble en agua y muy irritante para las mucosas respiratorias y de los ojos (*véanse las páginas 46 y 60*). En altas concentraciones tiene efectos venenosos, por lo que se recomienda tener precauciones en su manejo. Las soluciones acuosas de formaldehído pueden contener hasta 50 % de formaldehído puro. En concentraciones al 1 y 2 % es un germicida efectivo y rápido, al 4% se recomienda para microorganismos esporulantes y micobacterias. No daña los metales o pintura de las instalaciones, en presencia de materia orgánica disminuye su actividad aunque mantiene un adecuado poder germicida. El uso de este producto en aspersión es efectivo para la desinfección de locales cerrados. **La exposición prolongada de los humanos y animales domésticos al formaldehído puede ocasionar daños en la piel, alergias y predisposición a neoplasias** (*véase la página 60*).

Procedimiento para la fumigación con formaldehído

Previo a la fumigación es necesario humedecer el ambiente de aquellos locales que se vayan a fumigar, ya que la efectividad del formaldehído aumenta cuando la humedad relativa alcanza el 60 % y la temperatura los

21 °C; por debajo de los 15 °C este producto no es muy efectivo. El método más empleado para la fumigación con formaldehído es mediante la adición de permanganato de potasio a la formalina. Se recomienda que por cada 30 metros cúbicos se utilicen 50 ml de formalina, a la que se le añaden 250 g de permanganato de potasio. Para que este gas ejerza su efecto es necesario dejarlo actuar por un tiempo mínimo de 8 horas.

El **glutaraldehído** es más potente que el formaldehído actúa en contra de bacterias, hongos, esporas y algunos virus. Se recomienda su empleo en superficies susceptibles a la corrosión en soluciones al 2 %, previamente activadas con bicarbonato de sodio al 3 %. El tiempo mínimo para las bacterias es de 30 minutos y para las esporas de 10 horas. Es necesario que después de la desinfección se laven adecuadamente las superficies desinfectadas.

El **cloro** es un gas de olor irritante, que ataca las formas vegetativas y a las esporas en concentración de 0.03 % en dos minutos y 0.2 % en 15 segundos. Es corrosivo y decolorante, se utiliza como sanitizador del agua; por sus propiedades irritantes es poco empleado y se utilizan con mayor frecuencia sus derivados, como el **hipoclorito de sodio** en solución acuosa al 5%.

El **yodo** es un agente de olor fuerte; los preparados de yodo se utilizan para animales y casi nunca para desinfectar locales debido a su precio. Tiene poder esporicida y fungistático a partir de 0.01% y fungicida a partir de 0.1%, preparados en alcohol de 70°

El **fenol** tiene un alto poder de penetración y de acción germicida en contra de microorganismos bacterianos, al elevar su temperatura aumenta su poder germicida, pero las esporas y los virus son resistentes, la presencia de materia orgánica disminuye su actividad, es muy tóxico y su olor es fácilmente absorbido por los alimentos. Se recomienda para la desinfección de las instalaciones pecuarias de bovinos, equinos y

aves en solución al 2 o 5%. El fenol al 5% es capaz de matar las esporas del ántrax en 48 horas. Los **ortofenilfenatos** son fenoles sintéticos ampliamente utilizados, tienen un alto poder germicida, viricida, fungicida, mantienen su actividad en presencia de aguas duras y materia orgánica, el aumento de la temperatura potencializa su acción y no son tóxicos, cáusticos o corrosivos. Se utilizan para la desinfección de alojamiento de animales, locales, pisos y tapetes sanitarios, en concentraciones de 0.4 y 1.2% respectivamente. A continuación se menciona un ejemplo de la mezcla (*Ambietrol*) de tres fenoles comúnmente utilizada en explotaciones pecuarias:

o-fenilfenol.....	10.0%
p-bencil-clorofenol.....	8.5%
p-terciario-amilfenol	2.0%
ingredientes inertes	79.5%

De esta mezcla se hacen varias soluciones según el uso que se le quiera dar:

- para limpieza y desinfección general al 0.4%
- para áreas muy sucias al 0.8%
- para tapetes sanitarios al 1.2%
- para nebulizaciones al 30%.

NORMAS DE SEGURIDAD DURANTE EL PROCESO DE DESINFECCIÓN

El uso de sustancias químicas desinfectantes puede representar un riesgo para la salud de los operarios que realizan la desinfección, por lo que se deben considerar las siguientes medidas:

- Identificar con una leyenda visible los recipientes que contengan los productos desinfectantes.
- Almacenar en un lugar alejado de alimentos y bebidas.
- Utilizar prendas protectoras, guantes, overoles, botas y en caso necesario mascarilla

antigás, durante la aplicación de los productos.

- Capacitar al personal en la atención de una posible intoxicación, y contar con un botiquín.
- Aplicar los productos a favor del viento.

ESTERILIZACIÓN POR CALOR

La acción letal del calor depende tanto de la temperatura como del tiempo que es aplicado; entre más elevada sea la temperatura más corto será el tiempo necesario para destruir a los microorganismos. La **ebullición** es el ejemplo más antiguo de este método de esterilización. Se recurre a este proceso para esterilizar jeringas, agujas y frascos cuando no se cuenta con autoclave. Las formas no esporuladas o vegetativas se destruyen a temperatura de ebullición en 10 minutos; sin embargo para destruir las formas esporuladas es necesario aumentar el tiempo de ebullición hasta 30 minutos. La adición de carbonato de sodio al 2% aumenta el poder germicida de este proceso.

En la **autoclave** la aplicación de calor húmedo combinado con presión y tiempo es uno de los métodos más efectivos para esterilizar material. Una autoclave es un recipiente para presión y debe ser considerado potencialmente peligroso. 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 de esta última hay un incremento de la temperatura. Al alcanzar la presión de **15 libras / pulgada²**, se obtiene una temperatura de **121 °C**, la cual debe mantenerse durante un mínimo de **15 minutos** para una **esterilización** adecuada.. 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. Cuando el aire ha sido expulsado y la cámara se ha llenado con vapor saturado, existe una relación entre la

temperatura y la presión (*véase el cuadro 27 en la página 216*); si existe aire, la temperatura será menor a la correspondiente a la presión del vapor. Una versión sencilla de autoclave esta representada por la **olla de presión** de uso doméstico, en la cual el vapor se genera por el calentamiento del agua contenida en su interior. En el cuadro 27 (*página 216*) las temperaturas y presiones de vapor comúnmente empleadas se muestran en tipo negro. Estos valores sólo son aproximados pero lo suficientemente exactos para todas las técnicas normales de esterilización.

Si se van a esterilizar medios de cultivo con autoclave, habrá que recordar que el exceso de calor es perjudicial para la mayoría de ellos. La tasa de penetración de calor en recipientes grandes es baja, especialmente cuando contienen agar. Cuando el volumen del medio de cultivo excede de un litro, el tiempo pero no la temperatura, deberá aumentarse, para tener la certeza que todo el contenido está mantenido a la temperatura requerida por el tiempo correcto. **La tempe-**

ratura en el interior del autoclave deberá descender a 90°C o menos antes de abrirla.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Best M, Sattar S A, Springthorpe VS and Kennedy ME.: Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*, *Jour. Clin Microbiol* 28:2234-2239, 1990.
- Treagan L and Pulliam L.: *Medical microbiology laboratory procedures*. 1st. ed. Philadelphia; W B Saunders Company, 1982.
- Casillas M A.: Esquemas de susceptibilidad de microorganismos específicos a los desinfectantes en: *Memorias del curso Desinfección y desinfectantes y su empleo en Medicina Veterinaria*, FMVZ, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp 52, agosto 1979.
- Rivera A O.: Manual de antisépticos y desinfectantes utilizados en las diferentes etapas del proceso de producción de la leche. *Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México*, México, D.F. 1979.

Cuadro 25. NIVELES DE ACCIÓN GERMICIDA

	Bacterias			Hongos ^a	Virus	
	Vegetativo	Bacilo tuberculoso	Esporas		Lipídicos de tamaño medio	No lipídicos y pequeños
<i>Alto</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Intermedio</i>	+	+	-	+	+	+
<i>Bajo</i>	+	-	-	+	+	-

^a Incluye esporas asexuales, pero no clamidosporas desecadas o esporas sexuales.

Cuadro 26. NIVELES DE ACTIVIDAD DE LOS GERMICIDAS MÁS UTILIZADOS.

<i>Producto</i>	<i>Concentración</i>	<i>Nivel de actividad</i>
Clorinados	0.1-0.5 % ^a	intermedio
Cloroexidina	0.75-4.0 %	bajo
Cuaternarios de amonio	0.1-0.2 % acuoso	bajo
Fenólicos, acuosos	0.5-3 %	intermedio a bajo
Formaldehído acuoso	3-8 %	alto
Formaldehído + alcohol	8 % + 70 %	alto
Glutaraldehído acuoso	2 %	alto
Hexaclorofeno	1 %	bajo
Mercuriales	0.1-0.2 %	bajo
Óxido de etileno	450-800 mg/L	alto
Peróxido de hidrógeno estabilizado (agua oxigenada)	6-10 %	alto
Yodo, acuoso	1 %	intermedio
Yodo + alcohol	0.5 % + 70 %	intermedio
Yodóforos	750-5000 mg/L ^b	alto a intermedio
Yodóforos	75-150 mg/L ^b	intermedio a bajo

^a Cloro libre, ^b Yodo disponible

Cuadro 27. RELACIÓN ENTRE LA TEMPERATURA Y LA PRESIÓN DEL VAPOR SATURADO.

<i>Temperatura</i>	<i>Exceso de presión por arriba de la atmósfera normal^a</i>		
	<i>°C</i>	<i>kN/m²</i>	<i>kg/cm²</i>
100	0	0	0
105	19	0.20	2.8
108.5	35	0.36	5.1
110	42	0.43	6.1
115	68	0.69	9.8
115.5	71	0.72	10.2
120	97	0.99	14.1
121	104	1.06	15.0
125	131	1.33	19.0
127	146	1.50	21.2
130	169	1.72	24.5
134.5	207	2.11	30.0

^a 103 kN/m², 14.7 lb/plg²

Notas: 1 lb/plg = 6.89 kN/m²; 1 kg/cm² = 98.1 kN/m²

Cuadro 28. PRODUCTOS PARA LA DESINFECCIÓN EN CASOS DE AFTOSA

<i>Producto</i>	<i>Concentración (%)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Exposición (horas)</i>
Ácido cítrico	0.2	20-30	12
Carbonato de sodio	4	20-30	10-18
Fenol	5	-	-
Formol	10	40-60	3
Hidróxido de sodio	2	60-70	-

También se recomiendan soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio 1200 ppm de cloro libre

Cuadro 29. PRODUCTOS PARA DESINFECCION EN CASOS DE BRUCELOSIS

<i>Producto</i>	<i>Concentración</i>	<i>Temperatura (C)</i>	<i>Tiempo (horas)</i>
Sol. de cloruro de cal	cloro activo 2 a 2.5 %	20	1
Sol. de sosa cáustica	2 %	70 a 80	3
Sol de cal apagada	10 a 20 %	normal	3
Emulsión de creolina	5 %	70 a 80	3
Sol. de formol	2 %	70 a 80	3

Cuadro 30. PRODUCTOS PARA LA DESINFECCION EN CASOS DE TUBERCULOSIS

<i>Producto</i>	<i>Concentración</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Exposición (horas)</i>
Sol. de cloruro de calcio	cloro activo al 5 %	20 a 30	3
Sol. de hipoclorito de calcio o sodio	cloro activo al 5 %	20 a 30	3
Formol	5 %	70 a 80	3
Fenol	2-3 %	70 a 80	12
Mezcla de sosa y formol	3 % de cada uno	70 a 80	3
Acido para-acético	1 %	20 a 30	3
Glutaraldehído	2 %	20 a 30	10 minutos

Cuadro 31. PRODUCTOS PARA LA DESINFECCIÓN DE RABIA Y ÁNTRAX

<i>Producto</i>	<i>Rabia (%)</i>	<i>Ántrax (%)</i>
Ácido clorhídrico		2.5
Ácido cresílico	4	
Ácido para-acético		3
Formol		5
Hidróxido de sodio		5
Ortofenilfenato de sodio	2	

También se recomienda el uso de vapor o incineración

Cuadro 32. PRODUCTOS PARA LA DESINFECCIÓN DE *SALMONELLA*

<i>Producto</i>	<i>Concentración (%)</i>	<i>Exposición (horas)</i>
Ácido láctico	0.5 ^b	
Fenol	2	10 segundos
Hidróxido de sodio	5	10-18 ^a
Glutaraldehído	0.15 ^b	

^a *La solución deberá emplearse hirviendo*

^b *Esas soluciones se recomiendan para reducir el nivel de contaminación superficial de las canales. Otras medidas para salmonelosis son: vaporizar o sumergir las canales de las aves en solución de cloro con 50 ppm, y radiaciones gama 3 kgy de la carne de las aves.*

Cuadro 33. PRODUCTOS PARA LA DESINFECCIÓN EN CASOS DE ENFERMEDAD DE AUJESZKY

<i>Producto</i>	<i>Concentración (%)</i>	<i>Exposición (horas)</i>
Formalina	3	3
Sosa cáustica	1	6
Sosa cáustica	3	3
Cloro	3	1
Hipoclorito de sodio	3	1
Ortofenilato de sodio	2	1

Cuadro 34. PRODUCTOS PARA LA DESINFECCIÓN EN CASOS DE FIEBRE PORCINA CLÁSICA (“CÓLERA PORCINO”)

<i>Producto</i>	<i>Concentración (%)</i>	<i>Exposición (horas)</i>
Ácido acético	2	3
Ácido cítrico	2	-
Carbonato de sodio	4	-
Formalina	10	3
Hidróxido de sodio	2	3
Ortofenilfenato de sodio	2	3

Índice

A

- Abomaso · 172
 conteo de vermes · 172
 fetal · 24, 55
- Aborto
Brucella · 126
 infeccioso · 23
 investigación de · 22
Leptospira · 23
 micotoxinas · 40
 nitratos · 23
 ovejas · 125
 patogenicia · 22
 perras · 125
 placentitis · 23
 viral · 157
- Abscesos · 111
 microabscesos · 162
- Acetato de uranilo · 107, 108
- Ácida, hematina · 60
- Ácido
 acético · 65, 79, 83
 alcohol · 65, 79, 80
 -alcohol-resistentes
 estructuras · 79, 80
 técnica de tinción · 79
 tinción de · 76, 79, 80
 cianhídrico · 36, 37
 clorhídrico · 37, 78
 colorante · 64
 fórmico · 59
 hialurónico · 32
 oxálico · 38, 39
 peryódico · 78
 pícrico · 47, 77
 papel impregnado con · 36
 prueba del · 36
 tinción de contraste · 79
 prúsico · 36
 sulfúrico, precaución · 50
 sulfúrico-difenilamina · 36
 tartárico · 36
- Acromáticos, objetivos · 51
- Actinobacillus pleuropneumoniae* · 112
- Adenovirus · 156, 158
- Adhesivo para portaobjetos · 64
- ADN · 92
- Adrenal · 18, 151, 159
- Aflatoxinas · 40
 fluorescencia · 56
- Aftosa · 155
 desinfección · 217
- Agglutinación · 126, 127
 completa · 128
 conversión de títulos a U.I. · 128
 definida de intensidad variable · 128
 en placa · 126, 127
 en tarjeta · 128
 interpretación · 128, 129
 lenta en tubo · 126, 127
 prueba para *Brucella* · 127
- Alcaloides · 35, 37
- Alsever · Véase Solución de Alsever
- Alteraciones *postmortem* · 14
- Amaranthus* · 35
- Amarillo, color de piel de fetos · 23
- Amibas · 173
- Amiloide · 56, 70
- Amniocentesis · 24
- Anaplasma* · 159, 173
- Anemia Infecciosa Equina · 148
- Anisotrópicos, materiales · 56
- Antibióticos · 74, 122, 147, 167
- Anticomplementarios, sueros · 138
- Anticongelante automotriz · 38
- Anticuerpos
 aumento de título · 154
Brucella · 127, 132
Brucella ovis y *B. canis* · 126, 127
 fluorescentes · 161
 rabia · 163, 164, 166, 167
 IgM en brucelosis · 126
 infección viral · 153
 marcados · 56, 87, 155
 neutralizantes · 153, 154
 protectores, título (rabia) · 169
 rabia
 titulación · 155
 títulos y protección · 157
 vacunales · 157
- Antígenos
 detección eficiente · 88
 recuperación · 45, 88, 93
- Antisépticos · 111, 211, 215
 alcohol · 211, 213
 piel y mucosas · 212
 tetraborato · 115
 toxicidad · 38
- Antracena · 35
- Ántrax
 desinfección · 217
 eliminación del cadáver · 12
 fenol · 214
 sospecha · 12
- Apocromáticos, objetivos · 51
- Araldita* · 106
- Arsénico · 34, 38, 39
- Articular, líquido · Véase Líquido sinovial
- Artificios, confusión por · 161
- Artritis Encefalitis Caprina · 148, 150
- Artritis viral · 148, 154, 155, 157
- Aspergillus* · 34

citrinitina · 40
fluorescencia · 56
micotoxinas · 39
 Astigmatismo, observación al microscopio con anteojos para corregir · 51
Astragalus woontonii · 35
 Atelectasia pulmonar · 17, 23
 Aujeszky · 25, 148, 154, 157, 158
 desinfección · 218
 Auramina O · 56, 80, 81
 Aurantia · 79
 Autoclave · 44, 211, 214, 215
 Autólisis · 11, 59
 en M.E. · 11
 y leptospirosis · 32
Avena · 35
 Aves
 histopatología de · 62
 Avidina · 89
 Avidina-biotina peroxidasa · 89
 Azul de metileno · 12, 80
 coloración con · 79
 cuerpos de Negri · 160
 en intoxicación por nitratos · 36
 Azul de tetrazolio · 87
 Azul de toluidina · 82

B

Babes, nódulos · 160
Babesia · 173
Bacillus anthracis · Véase Antrax
 Bacterias
 aislamiento · 109
 anaerobias · 111, 112
 contenido abomasal fetal · 24
 en cortes histológicos · 69
 en leche · 120
 intracelulares · 126
 LCR · 31
 líquido amniótico · 24
 multiplicación · 59
 proliferación en suero · 136
 tinción de auramina · 80
 tinción de Giemsa · 77
 tinción de Gram · 77
 tinción de PAS · 79
Balantidium · 173
 Bálsamo de Canadá · 66
 Bang, prueba del anillo de · 126
 BAPS (solución de albúmina bovina fosfatada) · 164
 Benzalconio · 211
 Biología molecular · 92
 Biopsias · 99
 diagnóstico de rabia · 167
 quirúrgicas
 contra punción con aguja delgada · 74
 descripción · 70
 Biotina · 93
Blastomyces · 78
 Bórax · Véase Tetraborato de sodio

Bouin · Véase Fijador Bouin
 Brenn y Brown, coloración de · 77
 Bronquitis infecciosa · 148, 154, 158
Brucella · 81, 125, 126
 abortus · 24, 25, 116, 125, 126, 127
 animales vacunados · 128
 antígeno · 126, 127, 128
 mastitis · 122
 aislamiento · 113
 canis · 125, 126
 desinfección · 217
 melitensis · 125, 126
 neotomae · 125
 ovis · 125, 126, 127
 suis · 125, 126
 vacunas · 126
 zoonosis · 25, 116

C

C.I. (índice de colorantes) · 67
 Calcificación distrófica · 70
 Calcio · 60
 técnica de VonKossa · 83
 California, prueba · 118, 123
 Camarones
 fijador · 49
 Cambios *postmortem* · 14
 Campo oscuro · 30, 52
 observación al microscopio · 24, 55
 observación de LCR · 31
Campylobacter · 24, 73, 113
Candida · 121
 Cápsula
 fibrosa · 64
 granuloma Tb · 115
 neoplasias · 70, 98
 renal · 18
 Causa
 de muerte · 13, 14, 71, 97
 Cavidad
 nasal · 73
 oral · 73
 Cefalorraquídeo
 líquido · 30, 36, 39, 55
 prueba de Pandy · 31
 Células cebadas · 82
 fijadores · 83
 gránulos · 79, 82
 Cerebelo, *Listeria monocytogenes* · 31
 Cianuro · 34, 35
 Citología · 30, 73, 97, 99
 diagnóstico de neoplasias · 97
 fijación · 73
 improntas · 73
 lavados · 75
 líquidos · 75
 raspados · 74
 sensibilidad · 75
 Citomegalovirus · 158
 Citrato de plomo · 107, 108

Clamidiasis · 12, 73, 159
 Clasificación de neoplasias · 98
Clostridium · 12, 73, 112
 Cólera porcino · Véase Fiebre porcina clásica
 Colesterol · 63
 Color de las lesiones · 15
 Colorante
 de contraste · 79
 de Jenner · 76
 Complemento
 fijación · 132
 microtécnica · 136
 sueros anticomplementarios · 138
 titulación · 134
 Congestión hipostática · 14
 Conjuntiva · 73
 Contenido estomacal fetal · 24
 Contraste de fases · 24, 30, 52, 55
 Corazón · 17, 18
 anomalías congénitas · 18
 fetal · 23
 Cordón umbilical · 22
 Cortes
 ángulo de la cuchilla · 63
 bloques de parafina · 62
 examen · 69
 finos · 82
 finos y semifinos · 106
 histológicos
 descripción · 69, 70
 identificación de partículas · 56
 inclusiones rápidas · 63
 microtomo · 64
 montaje · 63
 por congelación · 62
 riñón · 47
 semifinos · 82
 Criostato · 61, 62, 167
 Cristales · 38, 46, 63
 Criterios de malignidad · 97, 98
Cryptococcus · 121
Cryptosporidium · 173
 Cuchilla
 para microtomo · 63
 afilado · 63
 ángulo de corte · 63
 desechable · 63
 Cuerpos de inclusión · 158, 161
 de rabia · 161
 hepatitis infecciosa canina · 162
 moquillo canino · 162
 no virales · 159
 virales · 47, 158
 Cultivo
 bacteriano de LCR · 31
 Brucella · 126
 celular
 adaptación al · 155
 placas para · 156
 líquido articular · 32
 CVS · 164, 166, 168, 169
Chlamydia · Véase Clamidiasis

D

Davidson · Véase Fijador Davidson
 DDT · 38
Demodex folliculorum · 173
 Dermatofitos · 116, 173
 Derriengue · 160
 Descalcificación · 60, 61, 79
 de lesiones tuberculosas · 61
 Descripción
 de laminillas · 70
 de lesiones macroscópicas · 15
 Deshidratación · 16
 Desinfección · 112, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218
 Determinación de edad fetal · 24
 Diafragma, punción · 16
 Diagnóstico · 25, 58
 abortos · 22, 23
 brucelosis · 125, 126, 132
 citológico · 73
 de masas palpables · 74
 diferencial · 13, 71
 enfermedades bacterianas · 109
 enfermedades virales · 145, 153, 154
 equivocado · 14
 etiológico · 13, 71
 histopatología · 58, 59
 intoxicaciones · 39
 leptospirosis · 140
 mastitis · 118
 metales pesados · 39
 morfológico · 13, 71
 necropsia · 13
 parasitosis · 170
 postmortem · 11
 presuntivo · 22
 rabia · 155, 160, 161, 162, 166, 167
 biopsias · 167
 clínico · 160
 diferencial · 161
 rápido · 30, 74
 transoperatorio · 73
 Diaminobencidina · 87, 89, 94
 Diarrea
 lesiones compatible · 16
 viral bovina · 25, 149, 155
 Dicumarina · 35
 Didymium, filtro para película Kodachrome · 52
 Dientes, inspección · 16
Diff-Quick · 173
 Digoxigenina · 93
 Dilución
 soluciones madre · 44
 DPX, medio de montaje · 66

E

Ectima contagioso · 146, 149
 Edad fetal · 24
 EDTA · 61, 146

contraindicaciones · 110
 Efecto citopático · 153, 156
 virus causantes de · 154
 ELISA · 40, 45, 123, 144, 148, 149, 150, 151, 152, 173
 Encefalitis · 31, 161
 diagnóstico diferencial · 161
 equina · 149, 162
 rábica · 160
 Encéfalo
 extracción · 19
 Encefalomiелitis aviar · 149
 Encefalopatía espongiiforme bovina · 149, 162
 Encino · 35
 Enfermedad Hemorrágica de los conejos · 149
 Enfermedades virales · 16, 24, 25, 73, 145, 148, 153, 158
 Enfisema intestinal · 14
Entamoeba · 173
 Enterotoxemia ovina · 13
 Enterovirus Porcino · 149
 Eosina alcohólica · 65
 Eosinófilos, LCR · 32
Epon · 106
Erlichia · 173
Escherichia coli · 121
 Especificidad · 166
 de la citología · 75
 Esterilización · 214
 Estomatitis papular bovina · 158
 Estomatitis vesicular · 155
 Estreptavidina · 93. *Véase* Avidina
 Estricnina · 13, 39
 diagnóstico · 39
 Etanol
 desinfectante · 212
 Etilenglicol y oxalatos · 38
 Etiología · 71
 Eutanasia · 11
 Examen
 animales recién nacidos · 23
 contenido abomasal fetal · 24
 de fetos abortados · 23
 de humor acuoso · 32
 fetal · 23
 de laminillas · 69
 de líquido sinovial · 32
 exudados y trasudados · 30
 microscopio de campo oscuro · 24
 Exudado
 bacteriología · 110

F

Fabricio, enfermedad de la bolsa de · 156
Fast red · *Véase* Rojo resistente
 Feto
 aislamiento de *Brucella* · 126
 Brucella · 113
 edad · 24
 observación en campo oscuro de líquido abomasal · 55

 sufrimiento · 23
 Fiebre aftosa · *Véase* Aftosa
 Fiebre catarral maligna · 150
 Fiebre porcina clásica · 150, 155
 desinfección · 218
 Fijación
 de improntas para Dx de rabia · 165
 perfusión · 106
 Fijación de complemento · 126, 127, 132
 Fijador · 46
 alcalinizado · 63
 biología molecular · 47
 Bouin · 46, 47, 61, 62, 83, 163, 170
 cuerpos de inclusión · 158
 células cebadas · 83
 cualidades · 59
 Davidson · 49
 formaldehído · 59, 60
 inmunohistoquímica · 47
 Jores · 49
 Karnowsky · 49
 preparación · 48
 Klotz · 49, 50, 59
 Klotz y Kaiserling · 49
 para museo · 49
 para tinción de Mann (rabia) · 48
 pH · 60
 rápido de sublimado de mercurio · 47
 relación · 59
 Susa · 48
 cuerpos de inclusión · 158
 temperatura · 60
 tiempo · 60
 Zenker · 47, 48, 59, 83
 Filtro
 barrera, para fluorescencia · 52
 difusor · 52
 excitador · 52
 gris · 52
 millipore · 30
 polarizado · 52
 verde · 52
 Fístula de la cruz · 113
 Floxina B y cuerpos de Negri · 163
 Flúor · 38
 Fluoresceína · 88, 93, 155, 164
 espectro de absorción · 56
 Fluorescencia
 eficiencia · 56
 hongos · 56
 rabia · 166
 tetraciclinas · 56
 Fluroacetato de sodio · 39
 Fontana-Masson y melanomas · 99
 Formaldehído · 59, 213
 desinfectante · 212, 213, 216
 fijadores · 46
 fumigación · 213
 polimerización · 60
 toxicidad · 60
 Formalina · 49, 50. *Véanse* Formaldehído y Formol
 Formalina al 10% · 47, 62, 83

Formol · 18, 47, 48, 59, 77, 78, 88, 99, 170, 172, 173, 213, 217, 218
 conservadores · 59, 213
 Fórmula desarrollo fetal · 24
 Fosfatasa alcalina · 87, 93, 94, 95
 Fosfatos
 formalina amortiguada · 60
 glicerina amortiguada · 165
 solución amortiguada · 60, 76, 82, 164, 165
 Fotografía
 al microscopio · 52, 53, 57, 77, 88
 al microscopio electrónico · 105
 de piezas de necropsia · 49
 médica (libro) · 57
 Frotis
 fijación · 73
Fusobacterium necrophorus, tinción · 79

G

Gabarro · Véase Pododermatitis
 Gangrena gaseosa · 112
 Gasser, ganglio · 20, 160
 Gastroentéricos, conteo de vermes · 172
 Gastroenteritis transmisible porcina · 150, 154, 155, 157
 Germicidas · 216
 Gestación · 73
Giardia · 173
 Giemsa · 12, 76, 99, 173
 bacterias en cortes · 77
 cuerpos de inclusión en rabia · 161
 frotis teñido de contenido abomasal · 24
 Glándula mamaria · 74, 97, 113, 115, 118, 119, 122, 148, 150
 Glicoproteínas · 79
 Glóbulos rojos al 2% · 133
 Glucosa, enterotoxemia · 13
 Glucósidos cianogénicos · 35
 Goodpasture · 77
 Gram · 12, 22, 24, 73, 77, 78, 121
 negativos, desinfección · 211
 positivos, desinfección · 211
 Granuloma tuberculoso · 115
 Gránulos de azufre · 112
 Grasa
 adrenales · 18
 atrofia serosa · 23
 autólisis · 59
 de pollo, coágulos · 18
 insecticidas · 38
 microscopio sucio · 54
 perirenal · 23
 Gumboro · 149, 154, 155
Gutierrezia sarothrae · 35

H

H.E.
 contra

tinciones especiales · 76
 rutina de tinción · 66
 técnica de tinción · 64
 tinción de frotis de contenido abomasal fetal · 24
Haemobartonella · 173
Haemophilus parahaemolyticus · Véase *Actinobacillus pleuropneumoniae*
Haemophilus somnus · 114
 Hapteno nativo · 129, 130
 Helecho macho · 35
 Hemadsorción · 156
 Hemaglutinación · 153
 Hematina ácida · 47, 60
 Hematoxilina · 47, 64, 65, 93
 acuosa · 94, 95
 alcohólica · 65
 de Ehrlich · 83
 de Harris · 65, 66, 89
 tinción de hongos · 79
 Hemolisina · 133
 Hemólisis · 121, 146
 Hemorragia
 en neoplasias · 70
 subcutánea en fetos · 23
 Hepatitis
 aviar · 150, 158
 infecciosa canina · 158, 161, 162
 Hepatonefrotoxinas · 35
 Hibridación *in situ* · 92, 93
 Hidrato de cloral · 49, 50
 Hidronefrosis · 19
 Hígado
 punción · 74
 revisión · 19
 Hiperplasia endometrial · 73
 Hipocampo · 161
 Hipoclorito de sodio · 120
 Hipoglicemia · 13
 Hisopo
 aislamiento bacteriano · 110
 aislamiento de anaerobios · 112
 aislamiento de *Brucella* · 113
 aislamiento de *Campylobacter* · 114
 aislamiento de *Salmonella* · 111
 aislamiento viral · 147
 células recuperadas · 32
 de articulaciones · 147
 frotis vaginal · 73
 limpieza microscopio · 54
 Histiocitoma · 97, 98
 Histopatología · 58
 Histoquímica · 76
 Dx de neoplasias · 99
 Historia clínica · 12
 Hongos · 79
 aislamiento · 109, 121
 tinción PAS · 78
 Hora de muerte, determinación de · 32
 Horno de microondas, fijado de tejidos · 60
 Huddleson, prueba de · 126
 Hueso · 12, 19, 32
 descalcificación · 60

plomo · 38
 tetraciclinas · 56
 Humor acuoso · 23, 32
 detección de estricnina · 39
 fetal · 23
Leptospira · 23
 potasio · 32
 toxicología · 23, 32

I

IBR · 151, 158, 159
 IgG · 126, 136
 IgM · 126, 136
 Impronta · 73
 contra corte · 59
 diagnóstico de neoplasias · 99
 Dx de neoplasias · 99
 fijador · 50
 tinción de Sellers (rabia) · 161
 transoperatorios · 73
 Inanición, lesiones · 23
 Inclusión
 en parafina · 59, 62, 63
 aves, reptiles y artrópodos · 62
 contra citología · 73
 Índice seroneutralizante · 154
 Inflamación y neoplasias · 99
 Influenza · 150
 Inhibición del efecto citopático · 154
 Iniciadores para *PCR* · 94
 Inmunodeficiencia combinada en potros · 17
 Inmunofluorescencia · 88
 Inmunohistoquímica · 87
 neoplasias · 99
 Inmunoperoxidasa · 87
 Inmunosupresión por micotoxinas · 40
 Inoculación en ratón para Dx de rabia · 161, 166
 Insecticidas · 39
 Insectos
 histopatología de · 62
 Inspección
 de cadáveres · 11
 de reactores a tuberculina · 114
 externa del cadáver · 16
 primaria · 16
 Interpretación de resultados · 157
 Intestino
 conteo de vermes · 172
 Intoxicación
 humor acuoso · 32
 Intradermoreacción
 en brucelosis · 126
 tuberculina, inspección · 114
Isodine · 212

J

Jenner, colorante · 76

K

Karwinskia humboldtiana · 35
 Klotz · Véase Fijador Klotz
 Köhler
 iluminación de · 54
 Köster · 82

L

Laminillas
 examen de · 69
 histopatología · 64
 Lámpara de microscopio · 51
Lantana camara · 35
 Laringotraqueitis aviar · 150, 154, 158
 Lavados nasales y bronquiales · 75
 LCR · 30
 células · 31
 proteína · 31
 Leche
 aflatoxinas · 40
 bacteriología · 120
Brucella · 113
 tuberculosis · 115
 Lepra · 79, 114
Leptospira
humor acuoso fetal · 23
 riñón fetal · 23
 Lesiones · 14
 agónicas · 14
 ausencia de · 39
 descripción · 15
 inanición · 23
 incidentales · 14
 intoxicación · 34
 macro y microscópicas · 71
 placenta · 24
 primarias · 14
 secundarias · 14
 suficientes para el Dx · 58
 Leucosis bovina · 150
 Linfoma · 19, 87, 98
 Lipofucsina · 84
 Líquido
 abomasal · 55
 abomasal fetal · 24
 amniótico · 23
 cefalorraquídeo · 30, 36, 39, 55, 75, 146
 de Bouin · Véase Fijador Bouin
 de la cámara anterior del ojo · Véase Humor acuoso
 pericárdico · 75
 pleural · 112
 sinovial · 11, 19, 32, 75, 115, 146
Brucella · 113
Listeria monocytogenes · 31, 161, 162
 Lugol · 48, 77
Lupinus · 35
Lyssavirus · 163

M

M.E-
 tinción de azul de toluidina · 82
 MacCallum-Goodpasture · 77
 Maedi · 123, 150
 Mann, tinción · 161, 163
 Manosidosis bovina · 71
 Marek · 149, 154, 155
 Mastitis · 111, 118
 caprina · 123
 ovina · 123
 subclínicas · 123
 Mastocitoma · 82, 98
 tinciones especiales · 99
 May-Grünwald-Giemsa · 76
 McMaster · 171
 Meconio · 23
 Médula ósea · 11, 19, 40, 47
 bacteriología · 111
 Brucella · 126
 Salmonella · 115, 116
 Melanina · 84
 blaqueado de · 84
 Melanoma · 84, 99
 amelanótico · 99
 células redondas · 98
 Meningitis · 13, 31, 55
 Meningoencefalitis tromboembólica · 114
 Mercurio
 detección · 39
 fijadores · 47
 intoxicación · 38
 lámpara · 52
 alineación · 53
 costo · 57
 Metacromasia · 82
 Metahemoglobina · 36
 Metástasis · 97, 98
 Metritis · 111
 canina · 125
 Mezcla crómica · 50
 Micobacterias · 73, 76, 79, 80, 116
 aislamiento · 114
 bacteriología · 115
 cortes congelados · 62
 descalcificación de granulomas · 79
 desinfección · 213, 217
 fluorescentes · 81
 histopatología · 61, 115
 mastitis · 122
 neumonía granulomatosa · 17
 nódulos linfáticos · 114
 notificación obligatoria · 80
 tetraborato · 115
 tinción Ziehl-Neelsen · 79
 Micotoxinas · 39
 Microabscesos · 162
 Microaerobiosis · 112, 114, 122
 Microscopio
 alineación · 53
 campo oscuro · 55

 contraste de fases · 55
 de luz ultravioleta · 164
 diámetro del campo visual · 51
 electrónico · 104, 105
 grosor del cubreobjetos · 51
 iluminación de Köhler · 54
 invertido · 53, 156
 condensadores · 52
 limpieza de lentes · 54
 lubricación · 52
 óptico · 51
 pobre definición · 54
 Microtomo, corte con · 63
 Mieloma · 19
 Mitosis · 70, 98
 Mixomatosis · 150
 Moco cérvico - vaginal · 114
 Molar, solución · 42
 Moquillo canino · 73, 158, 161, 162
 Morgagni · 13
 Mucopolisacáridos · 79
 Mucoproteínas · 79
 Muerte
 accidental de patólogo · 12
 causa de · 13, 14, 23, 34, 71, 97
 celular · 59
 súbita · 13
 tiempo transcurrido · 32
 Muestras, toma correcta · 58
 Murphy, ley de · 25, 58, 116
Mycoplasma · 92, 115, 121, 122, 123

N

Necropsia
 articulaciones, huesos y músculos · 19
 bacteriología · 110, 111
 cavidad abdominal · 18
 cavidad torácica y abdominal · 16
 citología en muestras de · 73
 contraindicaciones · 12
 corazón · 17
 eliminación de desechos · 20
 encéfalo · 19
 eviscerado · 17
 fetos · 22
 historia clínica · 12
 inspección primaria · 16
 interpretación de lesiones · 14
 ojo y oído · 20
 precauciones · 12
 técnica · 15
 Necrosis
 diferenciar de autólisis · 59
 encefalomielitis equina · 162
 polioencefalomalacia · 162
 por tricocenos · 40
 tipo · 70
 Negri, cuerpos de · 47, 160, 161, 162, 163, 166, 167
 Neoplasias · 70, 87
 células redondas · 98

en tejidos blandos · 97
 epiteliales · 98
 malignas indiferenciadas · 99
 más frecuentes · 97
 mesenquimatosas · 98
 pseudocápsula · 98
 zona de comprensión · 98
 zona reactiva · 98
Neospora · 159, 173
 Neumonía · 13, 16, 17
 fibrinosa · 17
 granulomatosa · 17
 progresiva ovina · 123
 supurativa · 17
 Neumotórax · 17
 Newcastle · 149, 154, 155
 Nitratos
 aborto · 23
 captación excesiva · 34
 diagnóstico · 36
 intoxicación · 31
 niveles normales en rumiantes · 36
 plantas con · 35
 Nitritos
 aborto · 23
 diagnóstico · 36
 LCR · 31
Nocardia asteroides · 79, 142
 Nódulos linfáticos · 16, 19, 74, 151
 Brucella · 113, 126
 M. paratuberculosis · 114
 Mycobacterium bovis · 114
 tuberculosis · 114
 Nombre de la enfermedad · 71
 Normal, solución · 42, 43
 Notificación obligatoria · 20, 80, 116, 124, 138, 144,
 152, 157, 169
 Nueva fucsina · 80, 87, 93, 94

O

OcratoxinaA · 40
 Oculares del microscopio · 51
 Ojo · 61
 azul · 25, 149, 154, 158
 estado de hidratación · 16
 extracción · 20
 humor acuoso · 32
 Organismos, descripción en cortes · 70
 Orina · 11
 alcaloides · 37
 arsénico · 38
 bacteriología · 111, 116
 Brucella · 113
 citología · 75
 DDT · 38
 estricnina · 39
 flúor · 38
 glucosa · 13
 Leptospira · 141, 142
 mercurio · 38

Mycoplasma · 115
 nitratos y nitritos · 36
 parásitos · 170
 talio · 38
 tuberculosis · 115
 Orquitis · 125
 Orthomixovirus · 156
 Osteomielitis · 112
 Otitis · 111
 Oxalatos · 34, 46, 56, 63
 cristales en riñón · 63
 diagnóstico · 38
 plantas · 35

P

PAD · 74
 Páncreas, revisión · 18
 Pandy, prueba de · 31
 Panleucopenia felina · 158
 Papanicolau · 50
 Papilomatosis · 150
 Parafina · Véase Inclusión en parafina
 Paraformaldehído · 47, 88
 Parainfluenza 3 · 151, 155, 157, 158
 Paramixovirus · 156
 Parásitos · 32
 conteo de · 172
 en cortes histológicos · 69, 87, 170
 histopatología de · 62
 Paratiroides · 16
 Paratuberculosis · 79, 80, 114
 Parvovirus · 151, 156
 bovino · 155
 canino, diagnóstico · 73
 PAS · 78, 173
Pasteurella · 112, 121, 123
 Patología clínica · 30
PBS · Véase Solución amortiguada de fosfatos
PCR · 92, 94
PCR in situ · 94
 Peritonitis · 111
 Peroxidasa · 93
 antiperoxidasa · 88
 Peso molecular · 42
 Peste porcina africana · 151
 Pezuñas, revisión · 23
 pH · 38, 65, 153
 fijadores · 60
 hematina ácida · 60
 mastitis · 118
 oxalatos · 63
 rojo de fenol · 60
 solución amortiguada · 45
 preparación · 46
 Piel · 70
 de fetos, color amarillo · 23
 dermatofitos · 116
 diagnóstico de rabia · 167
 punción con aguja delgada · 74
 Piometra · 73, 111

Pirrolizidina · 34
 Pituitaria (hipófisis) · 20
 Placenta
 lesiones crónicas · 24
 placentitis · 23
 tinción Köster · 81
 Plantas tóxicas · 34
 Pleomorfismo · 70
 Pleuritis · 111
 Plomo · 38, 39, 159
Pneumocystis carinii · 173
 Pododermatitis · 112
 Polarizada, luz · 38, 52, 56, 63
 Polimerasa · 94
 Polioencefalomalacia · 31, 161, 162
Postmortem, cambios · 14
 Potasio · 32
 Precipitación · 126
 Preparación de soluciones · 42
Primer · Véase Iniciadores para PCR
 Próstata
 inflamación · 74
 punción · 74
 Proteína
 LCR · 31
 líquido articular · 32
Prototheca · 121
 Protozoarios
 observación · 24, 55
 Prozona, fenómeno de · 127
PRRS · 23, 25, 152, 154
 Prueba
 anticuerpos fluorescentes · 164, 166
 de ácido picrico para Ác, cianhídrico · 36
 de aglutinación lenta en tubo · 127
 de aglutinación para *Brucella* · 127
 de California · 118
 de inoculación en ratones · 161, 166
 de Pandy · 31
 de Reinsch · 39
 de Wisconsin · 118
 Psamoma, cuerpos de · 70
 Pseudomelanosis · 14
Pseudomona · 121, 123
 Pulmón
 atelectasia · 23
 consolidación vs atelectasia · 17
 edema · 14, 16, 17
 enfisema · 16
 examen de · 69
 fetal · 23
 células escamosas · 23
 fijación · 60
 neumonía intersticial · 17
 neumotórax · 17
 pleuritis · 17
 punción · 74
 textura · 17
 tinción de VonKossa · 83
 Punción con aguja delgada · 74, 99

Q

Queratina · 23
 Quiste hidatídico · 74

R

Rabia · 146, 151, 155, 158, 160, 169
 cuerpos de inclusión · 158
 desinfección · 217
 diagnóstico en biopsias · 167
 diagnósticos diferenciales · 161
 exactitud de la prueba de anticuerpos fluorescentes ·
 166
 fijación · 47, 48
 fijadores con mercurio · 47
 histopatología · 160, 161
 inoculación en ratón · 166
 lesiones macroscópicas · 13
 necropsia · 12
 seroneutralización · 153, 155
 seroneutralización en ratón · 167
 Recuperación de antígenos · Véase Antígenos,
 recuperación
 Reed y Muench · 154
 Refrigeración y autólisis · 60
 Reinsch, prueba de · 39
 Reptiles
 histopatología de · 62
 Salmonella · 115
 Revisión y descripción de laminillas · 69
 Rhodamina · 93
Rigor mortis · 18
 Rinitis porcina · 158
 Rinoneumonitis Viral Equina · 151, 158
 Rinotraqueitis infecciosa bovina · 151, 155, 158
 Rinotraqueitis viral felina · 159
 Riñón · 18
 detección de metales tóxicos · 39
 hidronefrosis · 19
 oxalatos · 63
 punción con aguja delgada · 74
 Rojo rápido · 94. Véase Rojo resistente
 Rojo resistente · 87, 93, 94, 95
 Rojo resistente nuclear · 87, 94
 Rosa de Bengala, prueba de · 126, 128
 Rosina, para diferenciar Giemsa · 76

S

Sacrificio humanitario · 11
 Sal, intoxicación en cerdos · 32
Salmonella · 111, 115
 desinfección · 218
 Sangre
 bacteriología · 110
 Brucella · 113
 Saponinas · 35
Sarcocystis · 159

Scrapie · 151, 162
 Schiff, reactivo de · 78
 Schneider, técnica para rabia · 167
Senecio · 35
 Seroconversión · 157
 Seroneutralización · 153
 en ratón para Dx de rabia · 167
 Silano · 64, 93
 Síndrome Disgenésico y Respiratorio del Cerdo · 23, 25, 152, 154
 Sinovial, líquido · Véase Líquido sinovial
 Sistema nervioso central, fijadores · 47
 Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A. C. · 57
 Solución
 amortiguada de fosfatos · 45
 de Alsever · 133
 de Holmes · 46
 de nueva fucsina · 80
 Hartman · 46
 isotónica NaCl · 45
 molar · 42
 normal · 43
 para descalcificar tejidos · 61
 Ringer · 46
 Sondas · 92
 Sorgo, ácido cianhídrico · 36
 Stamp · 81
Staphylococcus · 81, 121, 122, 123, 124
Streptococcus · 24, 121
 Suero · 146
 Sufrimiento fetal · 23
 Surfactante pulmonar · 24
 Surfactantes · 211
 Susa · Véase Fijador Susa

T

T-61, eutanasia · 11
 Talio · 38, 39
 Taninos · 34
 Tarjeta, prueba de aglutinación · 128
 Testículo
 fijación · 47
 punción con aguja delgada · 74
 Tetraborato de sodio · 46, 115
 Tetraciclinas, fluorescencia · 56
 Tetraóxido de osmio · 106
 Timo, revisión · 17
 Timol · 64
 Tinción
 auramina · 80
 azul de toluidina · 99
 fluorescente para micobacterias · 80
 Giemsa · 76
 Gram · 77
 H.E. · 64
 Köster para *Brucella* · 81
 Mann · 163
 negativa, ME · 107
 Seller · 161, 162, 163

 Ziehl-Neelsen · 76, 79
 Tiroides · 16, 74
 Títulos
 Leptospira · 143
 serológicos · 154, 157
 aves · 158
 bovinos · 158
 cerdos · 158
 Torsión del cordón umbilical · 22
 Toxicología · 34
 Tóxicos
 metales pesados · 39
 plantas · 34
 signología · 38
Toxoplasma · 159, 173
 Toxoplasmosis · 23, 32, 157
 Tratamiento antimicrobiano · 110
 Traumatismo, lesiones indicativas · 23
 Treponemas, diagnóstico · 73
 Tricotecenos · 40
Trichomona · 24, 173
 Trombos · 22
Trypanosoma · 159, 173
 Tuberculina
 reactor positivo · 114
 Tuberculosis · Véase Micobacterias
 Tumor
 benigno · 71, 97, 98
 células redondas · 98
 de tejido blando · 99
 glándula mamaria · 97
 interno · 99
 maligno · 71, 97, 98
 venéreo transmisible · 98

U

Ultravioleta, luz · 56
 Unidades internacionales y títulos de *Brucella* · 128
 Uratos · 46, 63

V

Vagina · 73
 Vermes gastroentéricos en rumiantes · 172
 Veronal · 133
 Vesícula biliar · 18, 113, 115
 Viruela · 152, 158
 aviar · 154
 Virus Sincicial Respiratorio · 152, 155, 157, 158
Visna · 123, 150
 VonKossa · 83

W

Warfarina · 39
 Warthin-Starry · 73
 Wisconsin

prueba · 119
Wright · 12, 173

Y

Yodo
de Gram · 77
desinfección · 112, 212, 213, 216
lugol · 48, 172
tinción de vermes · 171, 172

Z

Zearalenona · 40
Zenker · *Véase* Fijador Zenker
Ziehl-Neelsen · 73, 76, 79, 80
Zoonosis · 12, 25, 116, 122, 125, 160, 169, 174

El libro **Diagnóstico Veterinario** presenta la información necesaria para tomar las muestras adecuadas, procesarlas e interpretar los resultados, de las técnicas diagnósticas modernas de mayor utilidad en Medicina Veterinaria para las condiciones de México y Latinoamérica

El texto trata en forma clara y concisa los aspectos teóricos, y presenta en forma fácil de seguir las indicaciones prácticas. Se ha escrito en un lenguaje accesible al lector medio, evitando tecnicismos innecesarios y disertaciones académicas.

En la preparación y revisión de este libro se han reunido mas de veinte distinguidos especialistas con reconocida experiencia en el tema que tratan.

El libro incluye un índice extenso y muy detallado, que facilita su consulta para encontrar con rapidez información diagnóstica.

Se incluyen listas de lecturas recomendadas para los lectores interesados en profundizar en un tema particular.

