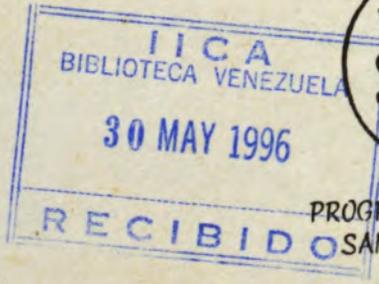




MINISTERIO DE AGRICULTURA
Y GANADERIA.



PROGRAMA NACIONAL DE
SANIDAD ANIMAL.

**Manual de Técnicas de Recolección
Conservación y Envío de Muestras
Veterinarias a los Laboratorios**

d

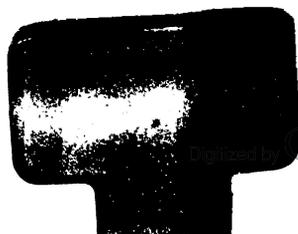


OFICINA EN ECUADOR

RED INTERAMERICANA DE LABORATORIOS DE
SALUD ANIMAL

Digitized by Google

236

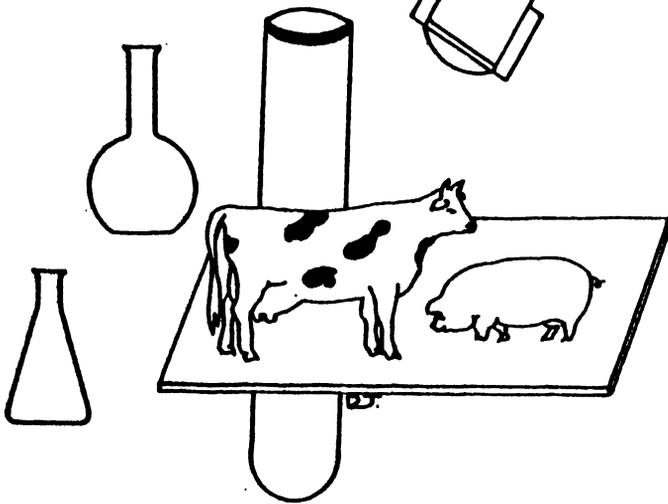


15170011

IICA
BIBLIOTECA VENEZUELA
30 MAY 1996
RECIBIDO

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA.
PROGRAMA NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL.

MANUAL DE TECNICAS DE RECOLECCION, CONSER-
VACION Y ENVIO DE MUESTRAS VETERINARIAS A
LOS LABORATORIOS.



Quito, Junio de 1990.

11CA
L70
03

00007170

I N D I C E

<i>Recolección y Envío de Muestras</i>	1
<i>Recolección de órganos y tejidos</i>	6
<i>Recolección de sangre</i>	12
<i>Recolección de orina</i>	17
<i>Recolección de leche</i>	19
<i>Recolección de muestras de heridas</i>	
<i>Abiertas: abiertas y exudadas</i>	21
<i>Recolección de heces</i>	24
<i>Recolección de semen</i>	27
<i>Muestra de feto y placenta</i>	29
<i>Recolección de exudado prepucial y vaginal</i>	31
<i>Raspado cutáneo</i>	33
<i>Muestras de agua y alimentos</i>	34
<i>Muestra de biológicos y Prod. Farmacéuticos</i>	36
<i>Muestras de Vesiculares</i>	38
<i>Colecta de Insectos</i>	40
<i>Envío muestra Rabia</i>	44
<i>Extracción cerebro de animal</i>	46
<i>Resumen, Recolección y Envío de muestras</i>	48
BACTERIOLOGIA	53
<i>Clasificación Morfológica de bacterias</i>	56
<i>Observación de microorganismo sin teñir</i>	58
<i>Técnicas de tinción</i>	58
<i>Preparación de frotis fijo para tinción</i>	61
<i>Tinciones simples</i>	63
<i>Tinciones diferenciales</i>	63
<i>Tinción de Gram</i>	63

<i>Modificación de Hucker.....</i>	<i>64</i>
<i>Tinción de Giemsa.....</i>	<i>65</i>
<i>Tinción ácido Resistentes.....</i>	<i>69</i>
<i>Tinción de estructuras.....</i>	<i>72</i>
<i>Tinción de esporas.....</i>	<i>73</i>
<i>Tinción de cápsulas.....</i>	<i>76</i>
<i>Tinción de flagelos.....</i>	<i>79</i>
<i>Tinción de Espiroquetas.....</i>	<i>83</i>
AISLAMIENTO.....	84
<i>Medio de cultivos.....</i>	<i>84</i>
<i>Clasificación de medios de cultivo.....</i>	<i>88</i>
<i>Medios de cultivos básicos.....</i>	<i>88</i>
<i>Medios enriquecidos.....</i>	<i>88</i>
<i>Medios selectivos</i>	<i>89</i>
<i>Medios de transporte.....</i>	<i>91</i>
<i>Preparación y distribución de los medios de cultivo.....</i>	<i>91</i>
<i>Preparación y distribución del agar en caja Petri...93</i>	<i>93</i>
<i>Distribución del medio de cultivo en tubos.....</i>	<i>98</i>
<i>Técnicas de sembrado en los diferentes medio de....</i>	<i>99</i>
<i>cultivos</i>	
<i>Inoculación de medio sólido en caja de Petri.....</i>	<i>102</i>
<i>Inoculación de tubos de agar inclinado.....</i>	<i>108</i>
<i>Inoculación de medios semi sólidos.....</i>	<i>110</i>
<i>Inoculación de medios líquidos.....</i>	<i>111</i>
<i>Identificación.....</i>	<i>112</i>
<i>Método de Portaobjeto.....</i>	<i>114</i>
<i>Prueba de leche con tornasol.....</i>	<i>115</i>
<i>Método de la gota suspendida.....</i>	<i>119</i>

<i>Método de dilución en tubo de ensayo.....</i>	<i>121</i>
<i>MICOLOGIA.....</i>	<i>123</i>
<i>Colección de muestras para aislamiento de.....</i>	<i>124</i>
<i>hongos patógenos</i>	
<i>Tratamiento de las muestras.....</i>	<i>125</i>
<i>Muestra y medio para aislar hongo.....</i>	<i>127</i>
<i>Material de Biopsia y Necropsia.....</i>	<i>132</i>
<i>Examen microscópico directo.....</i>	<i>133</i>
<i>Cultivo de los hongos.....</i>	<i>135</i>
<i>Técnicas de tinción.....</i>	<i>140</i>
<i>Micosis exclusivamente tegumentarias.....</i>	<i>144</i>
<i>Clasificación.....</i>	<i>144</i>
<i>Diagnóstico Micosis.....</i>	<i>146</i>
<i>Diagnóstico preliminar tiñas.....</i>	<i>149</i>
<i>Micosis inicialmente tegumentarias.....</i>	<i>151</i>
<i>Candidosis.....</i>	<i>162</i>
<i>Aspergilosis.....</i>	<i>166</i>
<i>Bibliografía.....</i>	<i>170</i>

M E N S A J E

La Representación del IICA - Ecuador, agradece la cesión de los derechos por parte del Dr. Raúl García Tinajero y el Dr. Rodolfo Córdova Ponce, para que se reproduzca gran parte del material contenido en el "Manual Ilustrado de Técnicas de Laboratorio utilizadas en Bacteriología y Micología Veterinarias".

Ha sido adaptado por la Dra. Germania Sánchez, Jefe de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, para ser utilizado por el personal Médico Veterinario que labora en el Programa Nacional de Sanidad Animal.

La adaptación y elaboración de este documento requirió del esfuerzo, dedicación y coordinación del Personal Especializado del Programa Nacional de Sanidad Animal -MAG. Por tal motivo el IICA - Ecuador, ha cooperado para reproducir esta publicación que será un valioso material de consulta para el personal auxiliar y profesional que durante 1989 - 1990 recibieron actualización y capacitación técnica.

La Representación del IICA en el Ecuador, se complace por este aporte y manifiesta su felicitación a todos los que cooperaron para la realización de esta útil obra.

Dr. Enrique E. Rieger B.
PROGRAMA V.
IICA - ECUADOR

Dr. Mario Blasco Lamenoa
REPRESENTANTE IICA - ECUADOR

P R E S E N T A C I O N

La información que aquí se presenta fue seleccionada y adaptada a nuestro país para manejarla en una forma simple y de rápida consulta. Se diseñó con el fin de que sirva de guía a los técnicos que trabajan en Laboratorios Veterinarios de Diagnóstico Primarios del Programa Nacional de Sanidad Animal como a nivel de campo para hacer una correcta recolección, conservación y envío de muestras a los Laboratorios de Diagnóstico, facilitando así la breve realización de los diagnósticos como la entrega de resultados.

Fue elaborada con el objeto de llenar el vacío que en ocasiones existe en cuanto al conocimiento de ciertas técnicas para la toma y envío de las muestras.

Se considera que resulta una herramienta útil al Médico Veterinario en su actividad dentro del Laboratorio, ya que mediante una buena recolección, toma, conservación y envío del material a observar, asegura una correcta y ágil respuesta, contribuyendo así al control de brotes de enfermedades.



Dr. Guido Cuadros Z.
DIRECTOR EJECUTIVO DEL
PROGRAMA NACIONAL DE SANIDAD
ANIMAL

2011/11/11

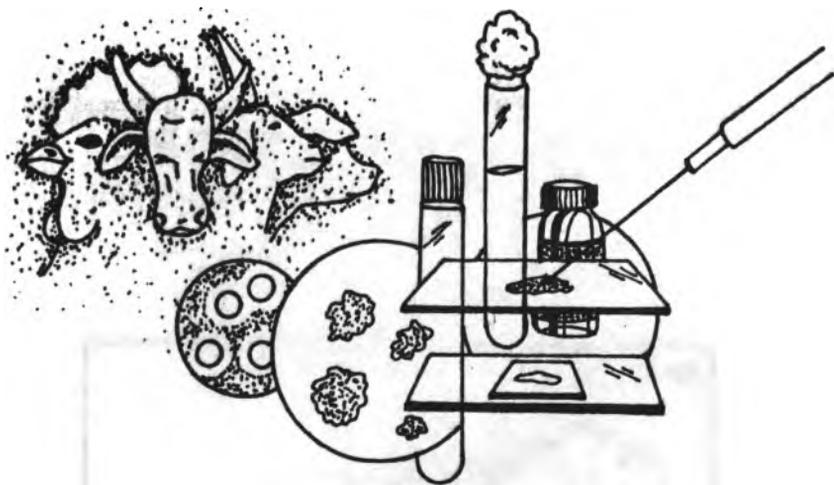
El presente informe tiene por objeto informar a la Junta de Control de la Gerencia General de la Empresa Pública de la ejecución de los trabajos realizados en el mes de noviembre de 2011.

En el mes de noviembre se realizaron los trabajos de mantenimiento preventivo y correctivo de los equipos de la planta de tratamiento de agua potable.

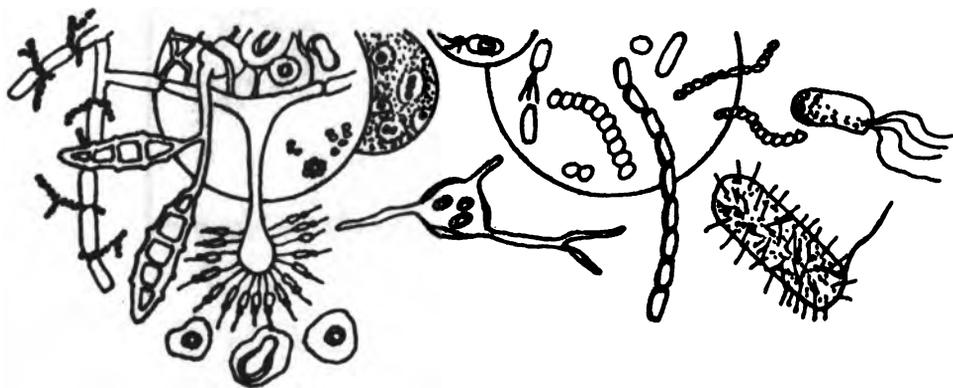
Los trabajos fueron realizados por el personal de la planta de tratamiento de agua potable, con el apoyo de la Gerencia General de la Empresa Pública. Se realizaron trabajos de mantenimiento preventivo y correctivo de los equipos de la planta de tratamiento de agua potable, con el apoyo de la Gerencia General de la Empresa Pública.



Dr. Guido Cordero S.
DIRECTOR EJECUTIVO
PROGRAMA NACIONAL DE SALUD
DEL

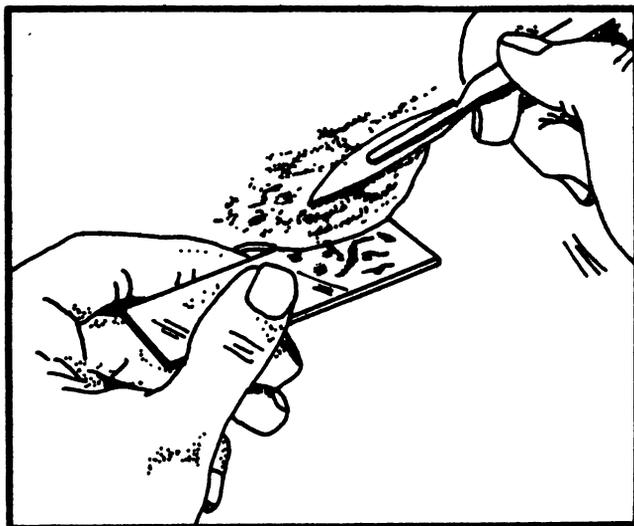


MANUAL ILUSTRADO DE TECNICAS DE RECOLECCION DE MUESTRAS PARA
LA RED DE LABORATORIOS DEL PROGRAMA NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL



Adaptado por:
Dra. Germania Sánchez L.
Jefatura Laboratorios Veterina-
rios del P.N.S.A.

RECOLECCION Y ENVIO DE MUESTRAS



RECOLECCION Y ENVIO DE MUESTRAS

El Laboratorio de diagnóstico es un auxiliar en el reconocimiento en las enfermedades de los animales.

El médico clínico en ejercicio tiene necesidad con frecuencia de consultar los laboratorios comerciales u oficiales para poder proporcionar un diagnóstico acertado.

Para poder obtener los resultados esperados es necesario que las muestras enviadas para el diagnóstico sean tomadas y enviadas de manera adecuada. Los resultados que arrojan estos análisis dependen:

- Del cuidado con que fueron tomadas
- Tiempo de recolección y conservación
- Eficiencia personal técnico realización de diagnóstico
- Criterio técnico con que se ha tomado la muestra
- Adecuada selección de la muestra.

El cuadro clínico inicial determinará el tipo de muestra que debe examinarse y tomarse.

Si los signos o síntomas señalan afección de un órgano o sistema específico, las muestras deberán obtenerse de tal fuente y no a la apariencia normal.

Si las lesiones a la necropsia sugieren la presencia de un agente bacteriano o micótico.

En la recolección y envío de muestras es recomendable los siguientes pasos:

- La muestra seleccionada para el laboratorio debe ser representativa del proceso infeccioso en cuestión.
- Es mejor enviar varias muestras del mismo lugar, aconsejable en brotes epidemiológicos con aves de corral, lechones u otros animales pequeños cuyo costo por unidad es mas bajo.
- Debe ser una cantidad suficiente a fin de lograr un estudio lo mas completo posible.

Tomar las muestras con valor confirmativo antes de la administración de cualquier medicamento.

- Emplear material estéril y tomar la muestra con asepsia a fin de no contaminar el producto durante su recolección.
- Evitar la desecación de las muestras, empleando medios de transporte adecuados, como caldo nutritivo, medio de tioglicolato, etc., para su traslado al laboratorio.
- Si el animal no muestra signos o síntomas de infección localizada, debe tomarse muestras seriadas de sangre para su cultivo.
- Si el germen aislado proviene de una región estéril se podrá considerar como el agente etiológico de la infección, ejemplo sangre, líquido celalorraquídeo, líquido sinovial y pleural.
- Las muestras deben ser remitidas al laboratorio y solicitar el diagnóstico a la mayor brevedad posible; generalmente se requiere muestras con no más de 24 horas, a menos que el conservador utilizado sea confiable.
- En la recolección de toda muestra el material a usarse debe ser esterilizado previamente utilizando la flama directa, la ebullición o el vapor según su naturaleza.
- El material que será utilizado para el envío de las muestras debe presentar condiciones estériles. De no contar con un sistema adecuada de esterilización, se recomienda a hervir todos los recipientes como frascos, tubos, etc., por 20 minutos.
- El resultado obtenido en el laboratorio es muy valioso para el diagnóstico y depende de muchos factores.
- El Médico Veterinario de Campo debe ser competente para realizar algunas técnicas sencillas que le permitan verificar el diagnóstico rápido y seguro de una enfermedad infecciosa.
- Debe conocer con seguridad como, cuando y donde debe tomarse la muestra; que exámenes deben realizarse e interpretar correlacionando los resultados de los análisis con el fin de que el material biológico llegue lo más pronto posible al laboratorio; debería considerarse la conveniencia de la forma de envío; además al remitir la muestra, es necesario comunicar al momento.

Para el envío correcto de una muestra al laboratorio de diagnóstico, es importante considerar tres puntos básicos:

- . Identificación correcta de la muestra
 - .. Método de la conservación
 - ... Historia clínica
- La identificación de la muestra es de primordial para el Laboratorio y debe reunir los siguientes datos:

Nombre del Propietario.....	Lugar.....
Descripción de los animales.....	Número.....
Fecha y hora de la muerte.....	Sexo.....
Nombre del animal.....	Fecha y hora de Recolección.....

- .. No hay que descuidar el vehículo de conservación de las muestras, tipo de conservador usado en la muestra antes de empaquetarla.

Como medio tenemos la refrigeración, ya que con hielo natural o hielo seco pero bien empaquetado, llega bien al lugar deseado.

- ... En cuanto a la historia clínica debe ser adecuada, recogiendo los datos necesarios emitidos por el dueño del ganado:

Curso de la enfermedad.....
Número de animales afectados.....
Índice de mortalidad y morbilidad....
Edad animales afectados....
Tipo de alimentos.....
Tipo de explotación....
Síntomatología individual y general
Calendario de vacunación
Tratamientos aplicados y sus respuestas. etc.

- Tomar la muestra antes de administrar cualquier medicamento.
- Las muestras deben ser remitidas con formularios de remisión numerados, fechados y firmados.
- Deben ir en un recipiente doble (fundas plásticas) y luego en caja de cartón.

- Deben ser recipientes individuales, colocarlos entre tubos o frascos, material que amortigüe golpes y absorva la humedad.
- Se enviarán las muestras bien identificadas, letra clara, precisar con marcadores de color las observaciones para ser enviadas. Ejemplo:
NO TOCAR - VENENO - PELIGRO - HACIA ARRIBA. Etc.
- Cuando no se cuenta con un adecuado sistema de refrigeración y se desea estudio bacteriológico, se emplea solución estéril de glicerina y agua al 50%, la cual demora la descomposición de la muestra.
- El medio más seguro de enviar una muestra al laboratorio es el directo, vía aérea, postal, etc. y además hacer una llamada telefónica avisando el envío, y la vía utilizada y hora.

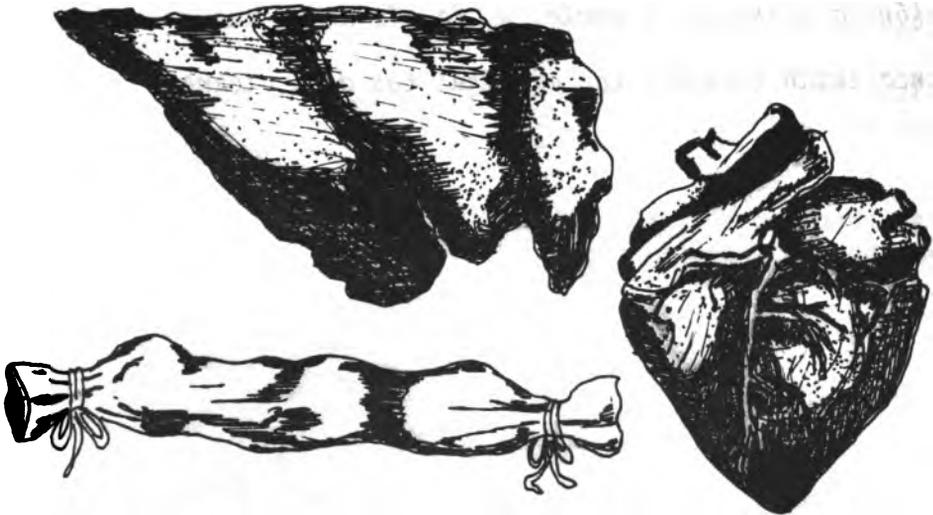
Nunca serán enviadas las muestras los días viernes.

RECOLECCION DE ORGANOS Y TEJIDOS .-

La toma de órganos y tejidos se realiza al momento de la necrosis, las muestras destinadas para estudio bacteriológico deben ser tomadas con precaución y como máximo una hora después de la muerte del animal.

Las muestras de elección serán víceras como: hígado, bazo, pulmón, corazón, riñón, cerebro e intestino, dependiendo del proceso infeccioso que se trate.

En animales pequeños se recomienda conservar el órgano completo mientras que en animales grandes se tomará un fragmento significativo que incluya la lesión.



Algunas ocasiones las muestras deben ser selladas flameándola directamente o utilizando una espátula previamente flameada para luego depositarlas en frascos individuales previamente esterilizados o hervidos; se prefieren frascos de boca ancha para facilitar el manejo de este tipo de muestras.

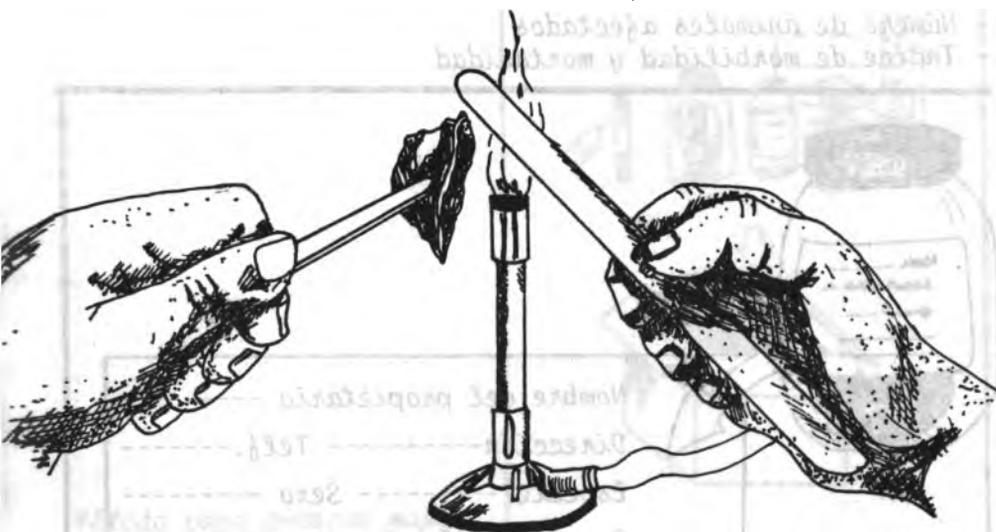
TIPO DE ENFERMEDAD Y ORGANOS A ENVIAR

ENFERMEDAD	MUESTRA
<i>Abomasitis</i>	<i>Animal entero, abomaso</i>
<i>Aborto</i>	<i>Placenta</i>
<i>Artritis</i>	<i>Animal entero vivo</i>
<i>Aspergilosis</i>	<i>Animal entero, órgano afectado, pulmones</i>
<i>Brucelosis</i>	<i>Abomaso y pulmones de feto</i>
<i>Candidosis</i>	<i>Animal entero, placenta</i>
<i>Carbunco</i>	<i>Animal entero, músculo</i>
<i>Cólera Aviar</i>	<i>Animal entero, hígado, pulmón, bazo e - intestino.</i>
<i>Colibacilosis</i>	<i>Animal entero, intestino delgado, bazo, ganglios linfáticos.</i>
<i>Coriza</i>	<i>Animal entero, órganos afectados</i>
<i>Criptococosis</i>	<i>Animal entero, pulmón, hígado, riñón</i>
<i>Desinteria</i>	<i>Animal entero y vivo</i>
<i>Edema intestinal del cerdo</i>	<i>Animal entero, encéfalo, intestino, - ganglios linfáticos.</i>
<i>Edema maligno y pierna negra</i>	<i>Animal entero</i>
<i>Enfermedad de Glasser</i>	<i>Animal entero</i>
<i>Enterotoxemia</i>	<i>Asa intestinal y tejidos afectados</i>
<i>Enfermedad crónica respirato<u>ria</u>.</i>	<i>Animal entero, órganos afectados</i>
<i>Erisipela</i>	<i>Animal entero, bazo, hígado, riñón, toncillas, ganglios linfáticos.</i>
<i>Espiroquetosis</i>	<i>Animal entero, bazo, hígado</i>
<i>Epidermitis</i>	<i>Animal entero, piel, riñón.</i>

(Continuación.)

ENFERMEDAD	MUESTRA
Gurma	Ganglios linfáticos
Hemoglobinuria bacilar	Hígado
Listeriosis	Placenta, encéfalo, médula
Paratuberculosis	Animal entero, ganglios linfáticos mesentéricos, cólicos y rectales
Paratuberculosis	Ganglios linfáticos, pulmones
Rinitis	Cerdo entero vivo, trompa
Salmonelosis	Animal entero, intestino, hígado riñón, bazo, pulmón.
Shigelosis	Animal entero, intestino, hígado bazo, pulmón.
Tuberculosis	Tejidos afectados
Tularemia	Animal entero, hígado y órganos afectados.
Vibriosis	Placenta.

SELLADO DE UNA MUESTRA DE ORGANNO



Quando no se cuenta con un adecuado sistema de refrigeración y se desea un estudio bacteriológico, se puede emplear una - solución estéril de glicerina y agua al 50%, la cual retarda la descomposición de mas muestras.

En general para el envío de una muestra al laboratorio de - diagnóstico es importante considerar 3 puntos básicos que son:

- 1.- Identificación de la muestra*
- 2.- Historia clínica y,*
- 3.- Método de conservación*

- 1.- La identificación de la muestra es de primordial importancia para el laboratorio y debe consistir en lo siguiente:*
 - Nombre del propietario o cliente*
 - Descripción de los animales*
 - Fecha y hora de muerte, así como la toma de la muestra*
 - Nombre o número del animal, si es de un hato o de manada*

Para el envío correcto de una muestra al laboratorio de diagnóstico, es importante considerar tres puntos básicos:

- Identificación correcta de la muestra
- .. Método de la conservación
- ... Historia clínica

- La identificación de la muestra es de primordial para el Laboratorio y debe reunir los siguientes datos:

Nombre del Propietario.....	Lugar.....
Descripción de los animales.....	Número.....
Fecha y hora de la muerte.....	Sexo.....
Nombre del animal.....	Fecha y hora de Recolección.....

- .. No hay que descuidar el vehículo de conservación de las muestras, tipo de conservador usado en la muestra antes de empaquetarla.

Como medio tenemos la refrigeración, ya que con hielo natural o hielo seco pero bien empaquetado, llega bien al lugar destinado.

- ... En cuanto a la historia clínica debe ser adecuada, recogiendo los datos necesarios emitidos por el dueño del ganado:

Curso de la enfermedad.....
Número de animales afectados....
Índice de mortalidad y morbilidad....
Edad animales afectados....
Tipo de alimentos.....
Tipo de explotación....
Síntomatología individual y general
Calendario de vacunación
Tratamientos aplicados y sus respuestas. etc.

- Tomar la muestra antes de administrar cualquier medicamento.
- Las muestras deben ser remitidas con formularios de remisión numerados, fechados y firmados.
- Deben ir en un recipiente doble (fundas plásticas) y luego en caja de cartón.

- Deben ser recipientes individuales, colocarlos entre tubos o frascos, material que amortigüe golpes y absorva la humedad.
- Se enviarán las muestras bien identificadas, letra clara, precisar con marcadores de color las observaciones para ser enviadas. Ejemplo:
NO TOCAR - VENENO - PELIGRO - HACIA ARRIBA. Etc.
- Cuando no se cuenta con un adecuado sistema de refrigeración y se desea estudio bacteriológico, se emplea solución estéril de glicerina y agua al 50%, la cual demora la descomposición de la muestra.
- El medio más seguro de enviar una muestra al laboratorio es el directo, vía aérea, postal, etc. y además hacer una llamada telefónica avisando el envío, y la vía utilizada y hora.

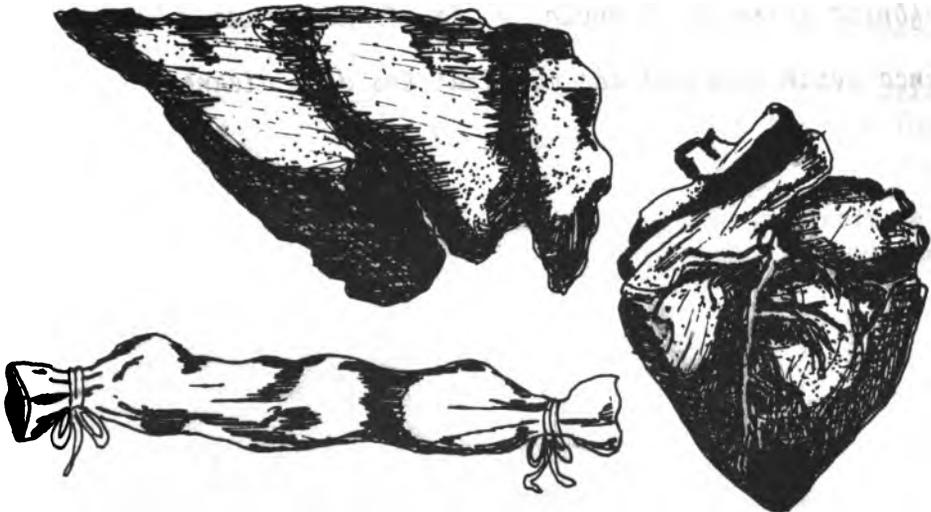
Nunca serán enviadas las muestras los días viernes.

RECOLECCION DE ORGANOS Y TEJIDOS .-

La toma de órganos y tejidos se realiza al momento de la necrosis, las muestras destinadas para estudio bacteriológico deben ser tomadas con precaución y como máximo una hora después de la muerte del animal.

Las muestras de elección serán víceras como: hígado, bazo, pulmón, corazón, riñón, cerebro e intestino, dependiendo del proceso infeccioso que se trate.

En animales pequeños se recomienda conservar el órgano completo mientras que en animales grandes se tomará un fragmento significativo que incluya la lesión.



Algunas ocasiones las muestras deben ser selladas flameándola directamente o utilizando una espátula previamente flameada para luego depositarlas en frascos individuales previamente esterilizados o hervidos; se prefieren frascos de boca ancha para facilitar el manejo de este tipo de muestras.

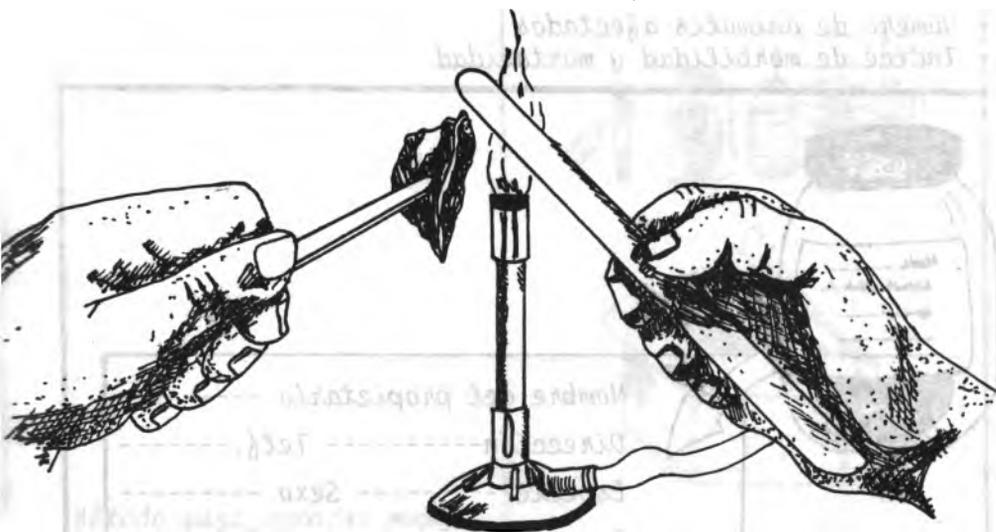
TIPO DE ENFERMEDAD Y ORGANOS A ENVIAR

ENFERMEDAD	MUESTRA
Abomasitis	Animal entero, abomaso
Aborto	Placenta
Artritis	Animal entero vivo
Aspergilosis	Animal entero, órgano afectado, pulmones
Brucelosis	Abomaso y pulmones de feto
Candidosis	Animal entero, placenta
Carbunco	Animal entero, músculo
Cólera Aviar	Animal entero, hígado, pulmón, bazo e - intestino.
Colibacilosis	Animal entero, intestino delgado, bazo, ganglios linfáticos.
Coriza	Animal entero, órganos afectados
Criptococosis	Animal entero, pulmón, hígado, riñón
Desinteria	Animal entero y vivo
Edema intestinal del cerdo	Animal entero, encéfalo, intestino, - ganglios linfáticos.
Edema maligno y pierna negra	Animal entero
Enfermedad de Glasser	Animal entero
Enterotoxemia	Asa intestinal y tejidos afectados
Enfermedad crónica respirato <u>ria</u> .	Animal entero, órganos afectados
Erisipela	Animal entero, bazo, hígado, riñón, ton- cillas, ganglios linfáticos.
Espiroquetosis	Animal entero, bazo, hígado
Epidermatitis	Animal entero, piel, riñón.

(Continuación.)

ENFERMEDAD	MUESTRA
Gurra	Ganglios linfáticos
Hemoglobinuria bacilar	Hígado
Listeriosis	Placenta, encéfalo, médula
Paratuberculosis	Animal entero, ganglios linfáticos mesentéricos, cólicos y rectal
Paratuberculosis	Ganglios linfáticos, pulmones
Rinitis	Cerdo entero vivo, trompa
Salmonelosis	Animal entero, intestino, hígado, riñón, bazo, pulmón.
Shigelosis	Animal entero, intestino, hígado, bazo, pulmón.
Tuberculosis	Tejidos afectados
Tularemia	Animal entero, hígado y órgano afectados.
Vibriosis	Placenta.

SELLADO DE UNA MUESTRA DE ORGANNO



Quando no se cuenta con un adecuado sistema de refrigeración y se desea un estudio bacteriológico, se puede emplear una - solución estéril de glicerina y agua al 50%, la cual retarda la descomposición de mas muestras.

En general para el envío de una muestra al laboratorio de - diagnóstico es importante considerar 3 puntos básicos que son:

- 1.- Identificación de la muestra
- 2.- Historia clínica y,
- 3.- Método de conservación

- 1.- La identificación de la muestra es de primordial importancia para el laboratorio y debe consistir en lo siguiente:
 - Nombre del propietario o cliente
 - Descripción de los animales
 - Fecha y hora de muerte, así como la toma de la muestra
 - Nombre o número del animal, si es de un hato o de manada

- 2.- Es necesario incluir una historia clínica adecuada y no omitir detalles tales como:
- Curso de la enfermedad
 - Número de animales afectados
 - Índice de morbilidad y mortalidad



Nombre del propietario -----

Dirección----- Telf.-----

Especie----- Sexo -----

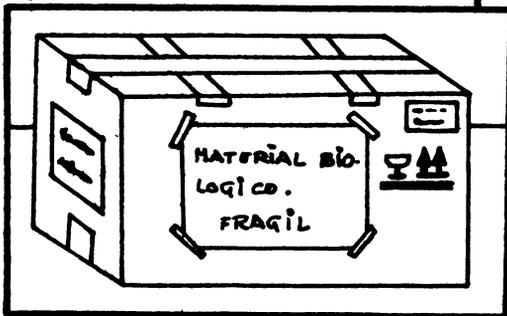
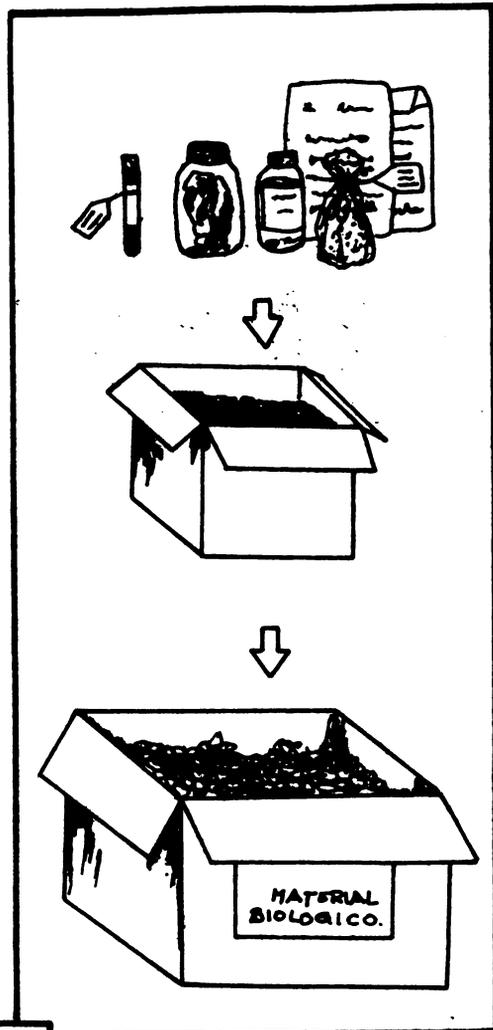
Raza----- Edad----- Color-----

Número -----

Descripción del caso -----

- Edad de los animales afectados
- Tipo de alimento (cantidad y calidad)
- Tipo de explotación (estabulación, semiestabulación, libre pastoreo, etc).
- Sintomatología general
- Sintomatología individual
- Calendario de vacunación
- Tratamientos aplicados indicando si hubo o no respuestas favorables a los mismos.
- Tipo de conservador usado en la muestra antes y durante su empaque.
- Y de ser posible el diagnóstico presuncional emitido por el Médico Veterinario Zootecnista.

Método para empacar muestras utilizando hielo natural como conservador.



Muestra lista para ser enviada .
Cada paquete debe incluir su res
pectiva hoja clínica.

RECOLECCION DE SANGRE .-

Recolección de sangre completa .-

Las muestras de sangre completa son remitidas al laboratorio, en todos aquellos casos en los que el proceso infeccioso cursen los signos como hematuria, hemoglobinuria, ictericia, etc. o bien se sospeche de una septicemia.

En la práctica veterinaria los exámenes hematológicos se realizan más satisfactoriamente con la sangre venosa. La punción venosa, mediante aguja y jeringa estériles se realiza en cualquiera de las venas superficiales, por ejemplo: en el caballo, la vaca, la oveja y la cabra, la vena de elección es la vena yugular. Las venas radial o safena puede elegirse en el gato y en el perro. La longitud y el calibre de las agujas utilizadas debe ser proporcional al tamaño del sujeto.

Para su recolección se recomienda la técnica acéptica descrita a continuación:

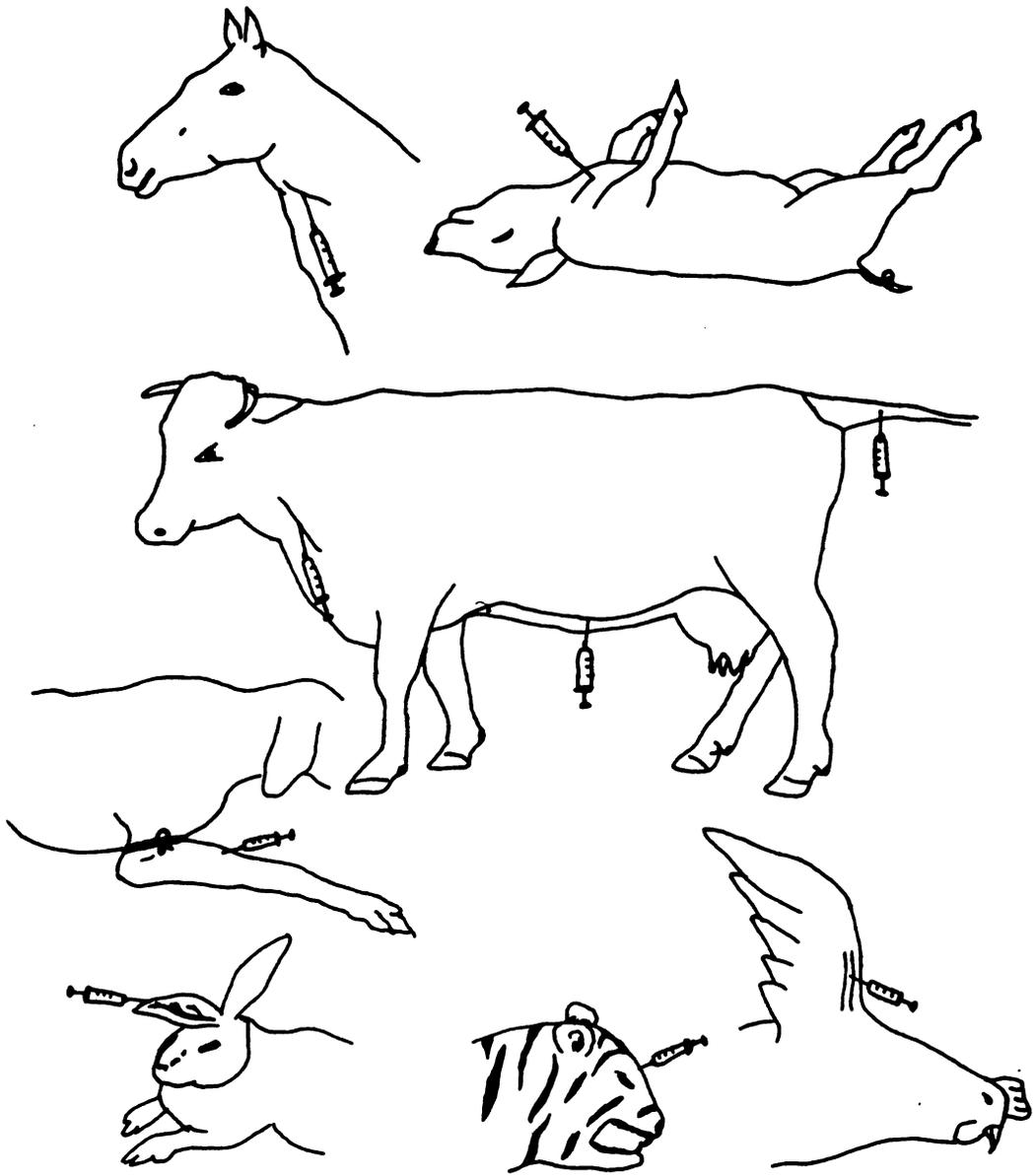
- Rasurar y lavar la zona
- Ligar y localizar la vena
- Desinfectar con yodo y luego alcohol al 70%
- Dejar secar la piel y evitar volver a tocar la zona, puncionar con jeringuillas estériles usando la aguja adecuada para cada especie

La cantidad de sangre varía y se obtiene no menos de 5 ml. y 10 ml. en grandes. Incluir la sangre en el tubo estéril con anticoagulante, se prefiere el polietano sulfonato de sodio (SPS) al 0.50-0.25% el E.D.T.A. no es aconsejable por inhibir los microorganismos. Para evitar la hemólisis se deben tomar ciertas precauciones: la aguja y jeringas deben estar estériles y secas, la sangre debe fluir libremente en la jeringa ejerciendo la menor aspiración en el émbolo.

Antes de pasar la sangre de la jeringa debe quitarse la aguja, al vaciar ésta sangre debe resbalar por las paredes del tubo y no caer directamente al fondo. Invertir suavemente varias veces para homogeneizar de una manera adecuada la sangre con el anticoagulante. La muestra se envía directa e inmediatamente bien identificada y refrigerada.

TIPOS DE ENFERMEDAD Y MUESTRA SANGUINEA

Abomasitis por <i>clostridium</i>	Sangre
Aborto	Suero de la madre
Antrax	Punción de oreja, sangre, frotis sanguíneo.
Botulismo	Sangre
Candidosis	Sangre
Colibacilosis	Sangre
Criptococosis	Sangre
Enfermedad de Glasser	Suero
Enfermedad crónica respiratoria	Suero
Erisipela	Sangre y suero, frotis sanguíneo.
Espiroquetosis aviar	Frotis sanguíneo
Hemoglobinuria bacilar	Sangre
Leptospirosis	Suero, sangre
Listeriosis	Suero
Muermo	Suero
Paratuberculosis	Suero
Tétanos	Suero
Tuberculosis	Suero
Tularemia	Suero
Vibriosis	Suero



Vías de sangrado utilizados en animales domésticos.

OBTENCION DE LA MUESTRA SANGUINEA

ESPECIE	SITIO	TAMANO DE LA AGUJA	
		CALIBRE	LONG. (Pulg.)
Equino.	Vena yugular	14-18	2.5 3.0
Bovino	Vena yugular, coxigea ventral.	14-18	2.5 3.0
Ovino	Vena yugular	16-18	2.5 3.0
Caprino	Vena yugular	16-18	2.5 3.0
Porcino	Vena cava anterior o auricular.	19 21	1.5 4.0
Canino	Vena cefálica o safena	20-22	1.5
Felino	Vena cefálica o safena	20-25	1.0
Conejo	Punción cardíaca, vena - yugular, vena auricular.	19-23	2.0
Hamster	Punción cardíaca, seno - retro-orbitario.	22-25	1.5
Cuyes	Punción cardíaca, seno retro-orbitario.	22-25	1.5
Ratón	Corte del apéndice caudal seno retroorbitario.	27 o tubo capilar.	1.0
Rata	Punción cardíaca, seno-retroorbitario.	25-27	1.0
Ave	Punción cardíaca, vena radial.	21-27	1.0

OBTENCION DE SUERO SANGUINEO .-

Para la obtención de suero sanguíneo, se recomienda que la sangre debe tomarse directamente en un tubo estéril sin ningún preservativo, y en cantidad de 10-20 ml. dependiendo la especie; no se debe de sangrar en recipientes de plástico ya que el suero no se separa del coágulo satisfactoriamente.

La técnica de muestreo es similar a la de la sangre, es importante dejar deslizar lentamente la sangre en la pared del tubo evitando la hemólisis; en el campo los tubos con la muestra se dejan a temperatura ambiente e inclinados hasta formarse el coágulo, una vez formado éste se colocan en refrigeración para su envío.

Cuando la muestra debe ser llevada de inmediato al laboratorio, se centrifuga a 2500 rpm durante 10' removiéndose cuidadosamente el suero con el fin de eliminar los glóbulos rojos que forman un paquete en el fondo del tubo .

Una vez que los tubos han sido identificados y sellados deberán colocarse en una bolsa de plástico que luego se guarda en congelación o refrigeración hasta el momento de su entrega al laboratorio.



RECOLECCION DE ORINA .-

El análisis de orina es uno de los procedimientos de laboratorio de más comunes aplicados a la práctica veterinaria, es de gran ayuda para el diagnóstico y diferenciación de padecimientos generalizados como la septicemia localizada del aparato genitourinario.

La muestra de orina puede obtenerse por dos métodos comunmente usados, en un recipiente estéril durante la micción espontánea o bien por medio del sondeo vesical en la mayoría de las especies.

Las muestras obtenidas por este último método son preferibles para estudios más exactos ya que están libres de ditritus uretrales o vaginales.

Las yeguas, vacas y perras se pueden catetizar con relativa facilidad, en todos los casos se debe usar instrumentos estériles junto con el espéculo apropiado en el caso de yegua o perra.

Es conveniente sondear al animal sin provocarle dolor o traumatismo que pueda provocar infecciones posteriores. En análisis pequeños, la muestra se obtiene por punción de la jeringa en condiciones sumamente estériles y auxiliados por una persona capacitada en el manejo del animal.



Punción vertical del conejo.



Obtención de orina en la perra.

Por micción espontánea, las muestras se obtienen satisfactoriamente del toro, del carnero y del macho cabrío por el método descrito de Besson que emplea una bolsa hembra de hule que atada al animal de tal forma que su abertura está yuxtapuesta al orificio prepucial; el aparato consta de un arnés que pasa por entre los cuernos anteriores y posteriores.

Otros métodos prácticos utilizados en la obtención de orina en las pequeñas especies:

Ejercer presión sobre la vejiga urinaria hasta lograr que fluya esta última, en los perros y gatos y la utilización de cajas de recolección limpias.

Para todos los métodos deben recogerse un mínimo de 12°C y ser depositado en un recipiente estéril el cual es remitido al laboratorio de diagnóstico lo más rápido posible y en refrigeración.

Cuando se requiera tomar una muestra de un animal durante la necropsia, esta deberá obtenerse directo de la vejiga, tratando de evitar el contacto con otras víceras o líquidos corporales, utilizando una aguja y jeringa estéril.

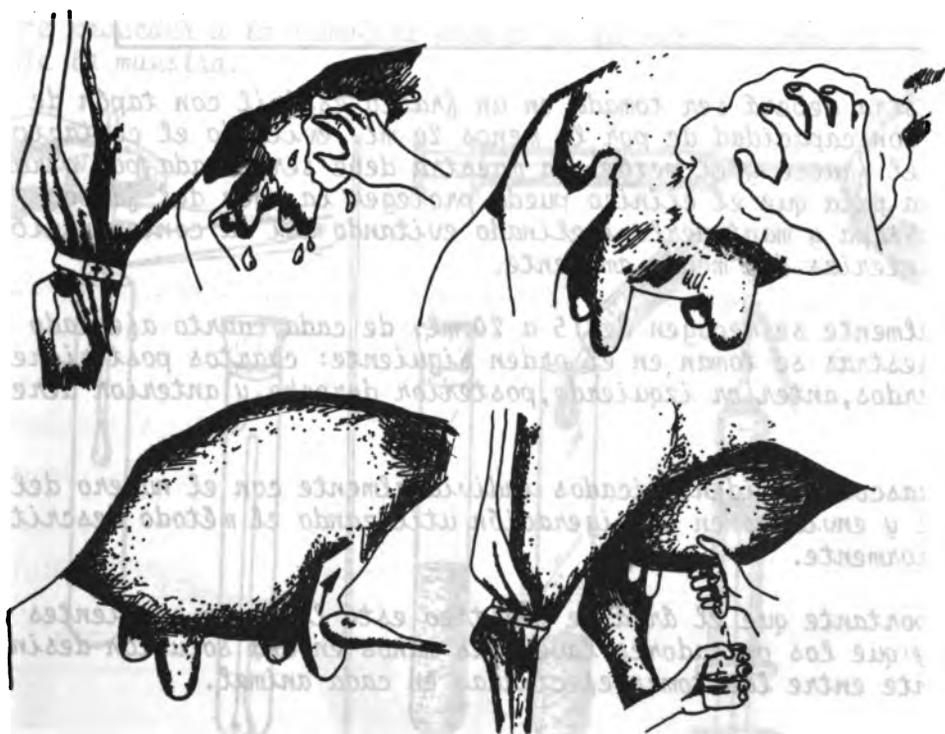
Debido que el diagnóstico de la bacteriuria depende del análisis cuantitativo es muy importante que la toma conservación y envío de las muestras se realice de manera adecuada y con cuidados extremos ya que las bacterias contaminantes pueden multiplicarse a la temperatura ambiente o invalidar por completo los resultados del análisis bacteriológico.

Si la muestra no puede ser analizada dentro de las dos primeras horas de colecta, debe ser refrigerada de inmediato.

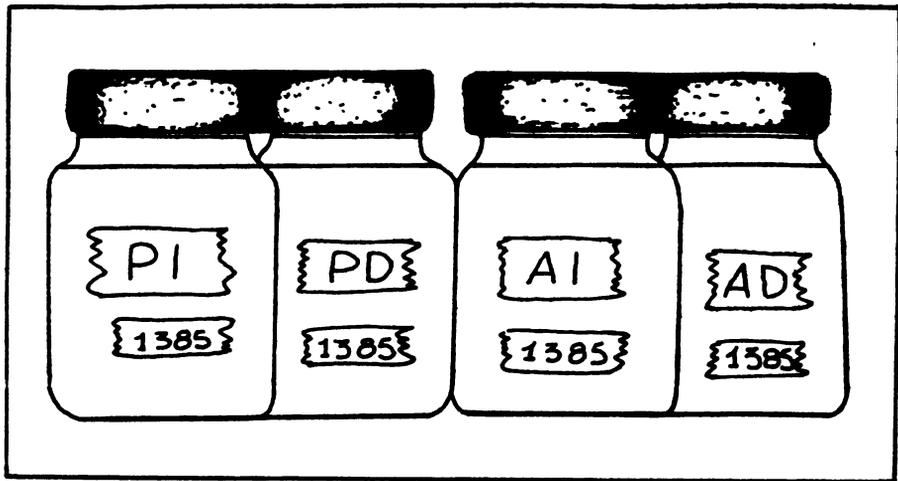
Enfermedad	Muestra
Candidosis	Orina
Criptococosis	Orina
Hemoglobinuria bacilar	Orina
Leptospirosis	Orina
Listeriosis	Orina
Pielonefritis	Orina

RECOLECCION DE MUESTRAS DE LECHE .-

Las muestras de leche son obtenidas y remitidas al laboratorio para demostrar de manera específica a los agentes etiológicos involucrados en los cuadros de mastitis. La muestra se deberá recoger después de depilar, lavar y secar la ubre sin eliminar los primeros chorros de leche, ya que éstos contienen mayor número de microorganismos infectantes. Utilizando un escobillón de algodón humedecido con una solución yodada o con alcohol al 70% se desinfecta el extremo del pezón dejando secar, la leche se obtiene ordeñando la cantidad necesaria y utilizando frascos estériles.



Técnica utilizada para obtener una adecuada muestra de leche en bovinos.



La muestra deberá ser tomada en un frasco estéril con tapón de rosca con capacidad de por lo menos 20 ml. evitando el contacto entre el frasco y el pezón; la muestra debe ser tomada por otra persona para que el clínico pueda proteger la boca del frasco con la tapa y mantenerlo inclinado evitando así la contaminación con bacterias del medio ambiente.

Generalmente se recogen de 15 a 20 ml. de cada cuarto afectado - las muestras se toman en el orden siguiente: cuartos posteriores izquierdos, anterior izquierdo, posterior derecho y anterior derecho.

Los frascos son identificados individualmente con el número del animal y enviados en refrigeración utilizando el método descrito anteriormente.

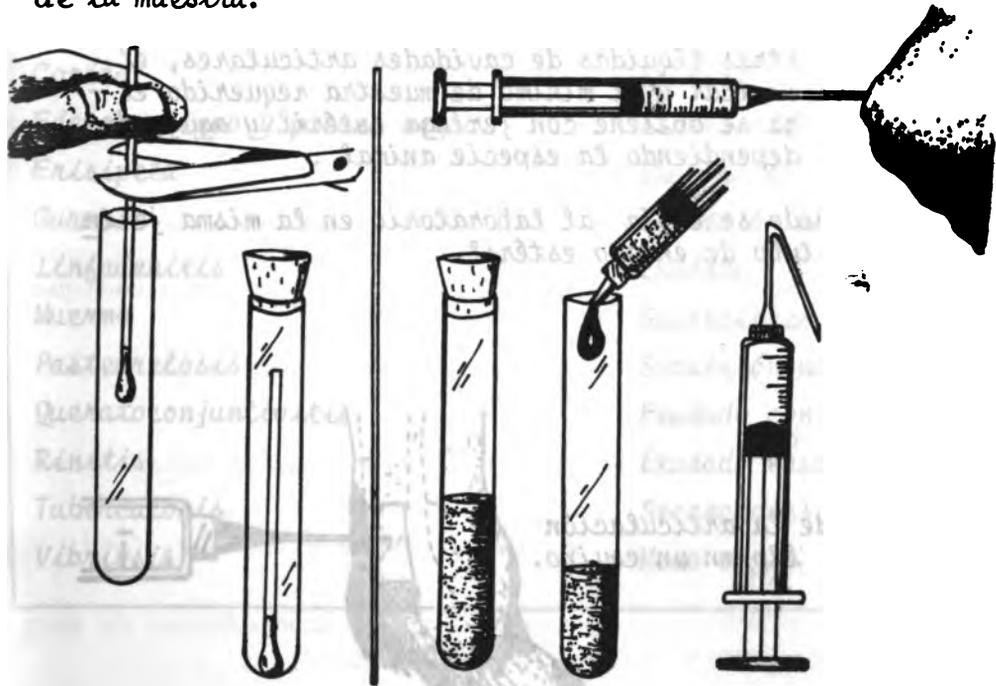
Es importante que el área de muestreo esté libre de corrientes de aire y que los operadores laven sus manos en una solución desinfectante entre las tomas efectuadas en cada animal.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE HERIDAS ABIERTAS, ABSCESOS Y EXUDADOS

Cuando en las manifestaciones clínicas se presentan secreciones o exudados las muestras de estas sustancias pueden ser de valor diagnóstico tal es el caso de Gonorrea, Queratoconjuntivitis, Linfadenitis caseosa.

En heridas abiertas o abscesos lo mismo que para frotis de garganta y otros exudados, los hisopos de algodón previamente esterilizados en tubos de ensayo son los que ofrecen las mayores ventajas.

A menudo es difícil recobrar el agente casual en una herida pues ella contiene muchos gérmenes contaminantes, por lo tanto se debe proceder a la limpieza previa de la herida antes de la toma de la muestra.



Métodos utilizados para la recolección y envío de muestra cuando el material requerido son hisopos o jeringas estériles.

Una vez tomada la muestra se procesa inmediatamente, pero si -
ello no es posible se debe evitar que se seque colocándola en
un tubo estéril con 2 o 3 ml. de caldo nutritivo o medio de -
transporte Stuart rompiendo el mango para eliminar la parte -
que ha estado en contacto con las manos.

En algunas ocasiones se requiere realizar exámenes de abscesos
edemas y hematomas para obtener este tipo de muestras, está -
indicado el empleo de punciones, la técnica de punción varía -
según el sitio donde se toma la muestra para todos los casos, -
el sitio de la piel donde se va a realizar la punción se debe
lavar y desinfectar, las agujas y jeringas deben se estar se -
cas y estériles lo mismo que los tubos o frascos empleados pa -
ra recolectar la muestra; cuando la muestra no puede ser aspé -
rada por lo denso del material, se puede inyectar en el sitio
solución salina o caldo nutritivo estéril.

En el cado de muestras líquidas de cavidades articulares, el -
procedimiento es similar y el mínimo de muestra requerido es -
de 1 cc. la muestra se obtiene con jeringa estéril y aguja de -
calibre variable, dependiendo la especie animal .

El líquido obtenido se envía al laboratorio en la misma jerin -
ga o bien en el tubo de ensayo estéril.

Punción de la articulación
del menudillo en un equino.



TIPO DE ENFERMEDAD Y MUESTRA DE HERIDAS, EXUDADOS Y ABSCESOS

ENFERMEDAD	MUESTRA
Absceso	Exudado
Actinobacilosis y Actinomicosis	Biopsia, exudado
Antrax	Líquido de edema
Artritis	Líquido articular
Brucelosis	Exudado vaginal
Coriza	Exudado
Edema maligno y puerna negra	Líquido de edema
Erisipela	Exudado articular
Gurra	Secreción nasal
Linfadenitis	Exudado
Muermo	Secreciones
Pasteurellosis	Secreción nasal
Queratoconjuntivitis	Exudado conjuntival
Rinitis	Exudado nasal
Tuberculosis	Secreciones, esputo
Vibriosis	Moco vaginal

RECOLECCION DE HECES , -

La recolección de heces se hace indispensable para la determinación de los diferentes parásitos y microorganismos causantes de los problemas gastro entéricos en todas las especies.

Las muestras deben de ser frescas y libres de impurezas en lo posible hasta el momento del examen en el laboratorio; porque en caso contrario, los huevos evolucionan y se diagnostica en forma equivocada.

Nunca enviar la muestra en tubo de ensayo de aglutinación o en recipiente de material absorbible como cartón, madera.

Se recomienda tomar la muestra directamente del recto utilizando un guante plástico o una funda. Tan pronto como la cantidad sea suficiente el guante o funda se revira hacia adentro y este sirve como recipiente para el envío.

No es recomendable enviar muestras recogidas del suelo, establo o corral. Si se envía en frascos, estos deben ser llenados totalmente, evitando el aire entre heces, además el frasco debe ser boca ancha.

Ubicar la etiqueta con los datos por fuera y enviarlo bien limpio. En las pequeñas especies se recomienda el uso de isopos, los cuales son enviados dentro de un tubo de ensayo que contenga cualquier medio de transporte para evitar su desecación.

La cantidad de heces para un diagnóstico en animales mayores, la cantidad debe ser no menos de diez gramos.

El recipiente se debe identificar con el número de la muestra con los siguientes datos:

Provincia, Cantón, Parroquia, hacienda, nombre del dueño, edad, sexo, datos de anamnesis.

Las muestras deben enviarse rápidamente a los laboratorios de diagnósticos y si se demoran hay que refrigerarlas.

TIPO DE ENFERMEDAD .-

Shigellosis

Heces

Enteritis

Heces

Amoebiasis

Heces-asa intestinal.

Paratuberculosis

Heces

Yersinia

Heces

Salmonellosis

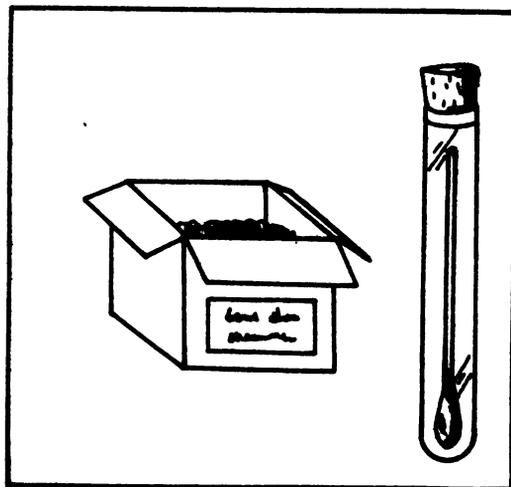
Heces

Shigellosis

Heces

Shigellosis

Heces



OBSERVACIONES :

Existen bacterias cuyas características de crecimiento Proteus por ejemplo, no permiten su aislamiento con facilidad para obtener cultivos puros en mos medios sólidos por lo que se hace necesario utllizar medios de cultivo duros (3-7% agar) que por su consistencia inhiben el abundante crecimiento en la superficie del medio, obteniéndose con esto colonias aisladas.

Quando se siembran especímenes líquidos, como sangre, líquido-sinovial, etc. en medios de cultivos líquidos, se necesita que haya 10 veces más la cantidad de cultivo que material sembrado.

Quando se emplea caldo tioglicolato o el medio de Tobertson para el aislamiento de anaerobios, deben calentarse durante 10 minutos en agua hirviendo para expulsar el oxígeno disuelto.

Para conservar los cultivos durante breve tiempo, deberán emplear se caldos o superficies de agar inclinadas ya que las cajas de Petri tienden a deshidratarse, a no ser que se cierren herméticamente con cinta de goma o de plástico.

La conservación de cepas de un cultivo puro, tiene gran éxito cuando se realizan preparados liofilizados o en su defecto, se congelan en caldos de cultivo.

RECOLECCION DE SEMEN .-

El semen es requerido cuando se sospecha de problemas de infertilidad en el macho, tal es el caso de Brucelosis entre otras causas, que provoca pérdida por este motivo.

Una muestra de semen se puede obtener por tres métodos: vagina artificial, estimulación de órganos sexuales accesorios y empleando el método de electroeyaculador.

El método más usado es el de la vagina artificial ya que nos ofrece la ventaja de poder recoger la totalidad del líquido eyaculado, en forma natural y además evitar la contaminación ambiental.

La estimulación de órganos sexuales accesorios, se realiza con palpación rectal, estimulando la próstata, vesículas seminales y la raíz del pene.

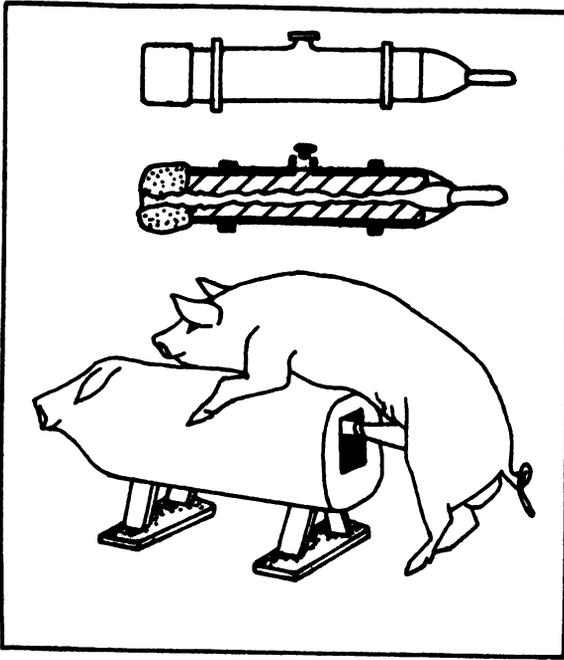
La manipulación manual de los genitales externos, es la técnica recomendada para la obtención del semen en el perro, en el cerdo y en las aves.

La estimulación eléctrica es practicada con éxito en el ganado ovino y los suinos; el método fue descrito por Gusom 1940.

Usando esta técnica el operador de no permitir la contaminación de la muestra, empleando solo material estéril. El semen normalmente es estéril, sin embargo es susceptible a contaminarse a su paso por la uretra.

Los frascos o tubos utilizados para su recolección deben presentarse en condiciones estériles y no contener ningún preservativo.

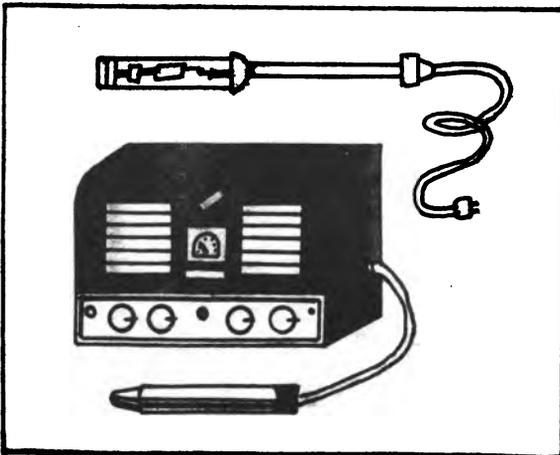
Las muestras deben ser enviadas en refrigeración y bien procesadas inmediatamente de ser posible.



Vagina artificial y su uso en el verraco.



Obtención de semen en las aves.



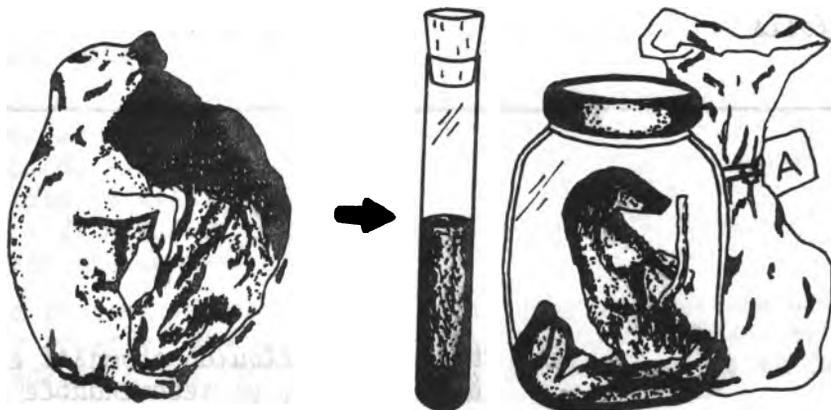
Electroejaculador

MUESTRAS DE FETO Y PLACENTA .-

El procedimiento a seguir, en el caso de la placenta es similar a utilizado en la recolección de órganos y tejidos, se pueden remitir porciones de placenta fresca que se encuentra dentro de la vagina (en todo caso la placenta que cuelga por fuera de la vulva, no es útil para el examen bacteriológico, por presentar un alto grado de contaminación en bacterias fecaloideas).

Para aquellos casos en los cuales no pueda obtenerse la muestra de líquido fetal (líquido intestinal, líquido abomasal u obtener porciones de órganos afectados) y puede además, obtenerse una muestra de sangre completa de la madre, sistema aceptable sobre todo si se sospecha de Brucelosis.

Si se desea un examen del feto, límpiese la suciedad, estiercol y



MUESTRAS RECOMENDADAS EN CASO DE ABORTO

paja y envíese al laboratorio preservando en hielo seco o hielo natural.

ALGUNAS ENFERMEDADES QUE PROBOCAN ABORTO

ENFERMEDAD	MUESTRA
<i>Aspergiloides</i>	Feto y placenta
<i>Brucelosis</i>	Feto y placenta
<i>Candidosis</i>	Feto y placenta
<i>Leptospirosis</i>	Feto y placenta
<i>Listeriosis</i>	Feto y placenta
<i>Vibriosis</i>	Feto y placenta

Obtención de líquido abomasal en un aborto bovino, es recomendable realizar una incisión que permita exponer el abomaso para la obtención de una muestra más pura.



COLECCION DE EXUDADOS PREPUCCIAL Y VAGINAL .-

examen de la secreción prepucial y vaginal por medio del microscopio: a través de un cultivo tiene gran importancia para el diagnóstico de aquellas enfermedades infecciosas que afectan inicialmente el tracto reproductor.

antes de recolectar la muestra se debe tratar que el animal esté libre de orina (en ambos casos) se depila, se lava con agua y jabón, da el área externa y en el caso de los machos, debe verificarse que el orificio del prepucio se mantenga seco.

Obtención de exudado prepucial .-

la secreción prepucial se puede obtener introduciendo una pipeta de plástico adaptada a un bulbo de goma especial o conectada a una jeringa en la parte más profunda de la cavidad, el orificio externo del prepucio se ata con una funda de caucho con la ayuda de una pinza y el exudado se puede aspirar al interior de la pipeta o de la jeringa mediante la succión de la misma.

se recomienda realizar un lavado de la cavidad prepucial introduciendo aproximadamente 30 ml. de solución salina estéril o un medio de cultivo (caldo nutritivo o caldo tioglicolato) con el líquido dentro de la cavidad se efectúan masajes de abajo hacia arriba por el espacio de 15 a 20 minutos, la muestra se recoge en la misma jeringa o en un frasco previamente esterilizado.

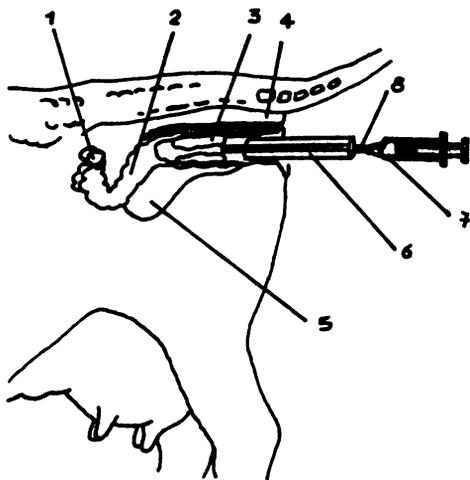
la muestra es remitida al laboratorio plenamente identificada y lo más rápido posible, debe incluirse una historia clínica completa haciendo énfasis en los problemas reproductivos presentes en la explotación.

Obtención de exudado vaginal .-

para obtener la muestra del tracto reproductor femenino se requiere además del material mencionado anteriormente un espéculo el cual se encarga de proteger el paso de la pipeta evitando la contaminación con la flora bacteriana normal de la vagina.

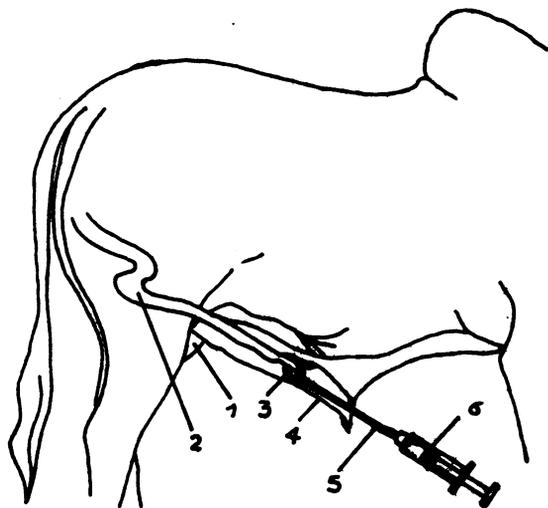
la secreción vaginal es por lo general una manifestación de infección uterina (piometra) o bien de una infección localizada, los agentes etiológicos involucrados son muy variados por lo que se recomienda obtener estas muestras utilizando medios de cultivo de transporte (principalmente medios reducidos como el caldo tioglicolato o el medio de Stuart). Continuación

Obtención de exudado uterino.



1. Ovario
2. Utero
3. Cérvix
4. Recto
5. Vejiga
6. Espéculo de vidrio
7. Jeringa
8. Pipeta de plástico

1. Testículo
2. Pene
3. Esperma
4. Prepucio
5. Pipeta
6. Jeringa



Recolección de secreción prepucial.

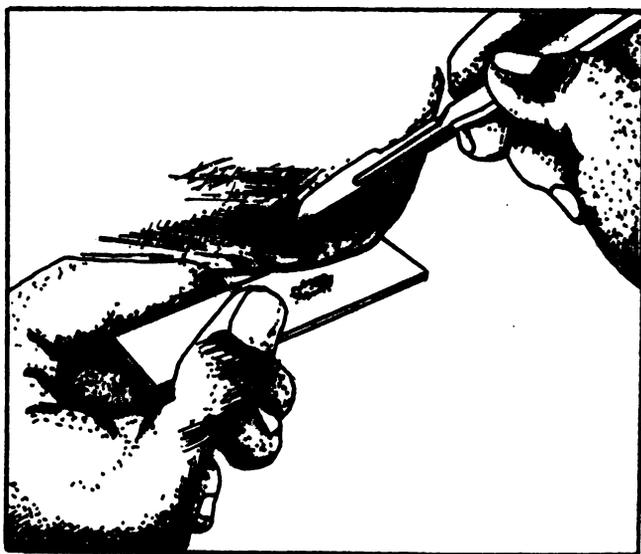
La muestra obtenida (utilizando el lavado uterino o vaginal) deberá ser remitido al laboratorio inmediatamente o bien mandarla debidamente refrigerada.

ASPADO CUTANEO .-

Con el objeto de descubrir la existencia de bacterias y hongos presentes en infecciones de la piel, siempre es conveniente efectuar un examen de las raspaduras y del material obtenido con hisopos, e también importante recurrir a la biopsia de la piel para poder examinar las estructuras más profundas.

Si se sospecha de infección por hongos la muestra se obtiene lavando la zona con agua y jabón, desinfectándola posteriormente con alcohol al 70%; el raspado cutáneo se puede realizar con una hoja de bisturí o con un portaobjetos tratando de incluir las escamas de las lesiones que tengan aspecto de actividad, si hay pelos afectados estos se arrancan con la ayuda de pinzas desde su raíz.

La muestra se envía sin refrigerar incluida en una caja de petri, en sobres de papel o entre dos portaobjetos.



En el caso de dermatitis de origen bacteriana la muestra se obtiene utilizando hisopos estériles, los cuales son remitidos al laboratorio en tubos de ensayo conteniendo algún medio de transporte como el tioglicolato.

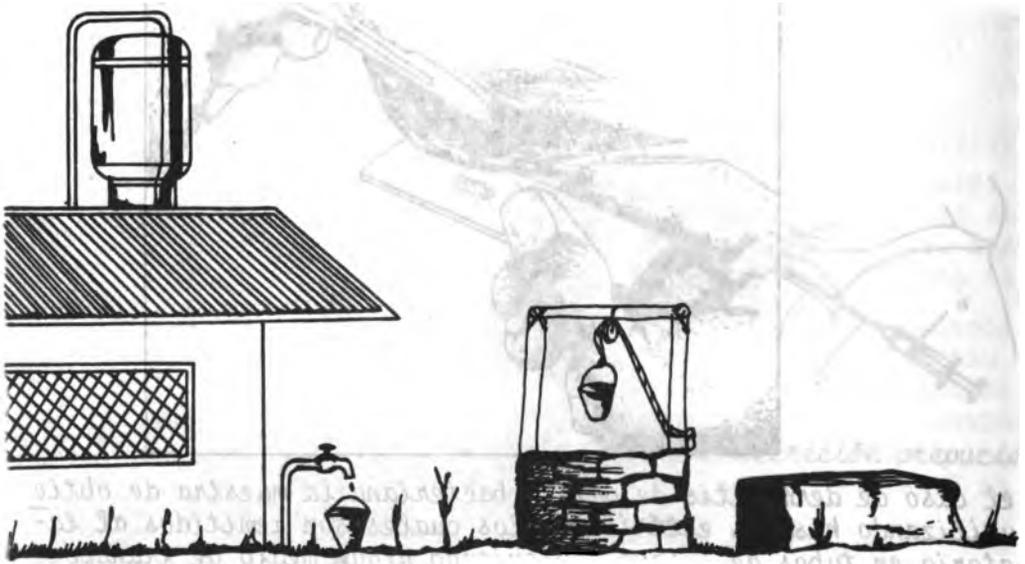
RECOLECCION DE AGUA Y ALIMENTO .-

Algunas enfermedades como Botulismo y Leptospirosis, pueden tener su orina en la contaminación del agua y alimento por lo que se hace necesario su análisis en el laboratorio.

Obtención de muestras de agua

Las muestras de agua se pueden obtener de diferentes lugares; - agua de acueducto o de yacimiento, pozos, ríos o tinacos. En el caso de aguas de acueducto las llaves se desinfectan cuidadosamente o bien se flamean utilizando un mechero de alcohol, se deja correr el agua durante un minuto antes de tomar la muestra la cual se recoge en frascos de boca ancha estériles cuidando que - al taparlos herméticamente quede poca cantidad de aire entre el nivel del líquido y la tapa.

En casos de muestras tomadas de pozos, ríos, yacimientos o tinacos, se utiliza el mismo tipo de recipiente, se acostumbra andarles un cordón o un alambre alrededor del cuello, dejarlos caer en el centro del pozo, estanque o río hasta que se llenen y taparlos. En caso de aguas quietas, se hace necesario tomar varias - muestras de diferentes sitios, previa agitación del área a muestrear. Se recomienda que al quitar la tapa del frasco se humedezca con alcohol la superficie externa del mismo así como la porción de alambre que vaya a penetrar en el agua prendiéndoles fuego para esterilizarlos.



muestras se deben enviar refrigeradas antes de las 12 horas de toma, solicitando el análisis cualitativo y cuantitativo corres
diente.

Atención de muestras de alimento .-

técnica de recolección establece una serie de precauciones, ello aplica en primer lugar precisar el objetivo de estudio, puede tratarse de un alimento sospechoso de haber causado una infección o toxicación, puede ser el caso de un alimento con un grado de frescura incierto o bien un problema de investigación sobre la causa de contaminación.

tamaño de la muestra (paso o volumen si es un solo producto aparentemente homogéneo, o el número de unidades si se trata de un lote) está determinado por ese objetivo y por supuesto en la práctica por cantidad de alimento disponible

Las recomendaciones generales son las siguientes:

Utilizar recipientes, bolsas y material estériles

Al coleccionar la muestra evitar contaminaciones del ambiente tales como polvo, tierra, líquidos o de cualquier otra naturaleza. El recipiente se abrirá justamente lo necesario para introducir la muestra.

Ai se trata de alimentos a granel, pacas de heno o silos habrá que retirar una porción, obtenerla de diferentes lugares evitando mezclarlas entre sí.

Si se trata de alimentos envasados, se deben coleccionar las unidades necesarias de acuerdo con el propósito del análisis; si es el caso de un producto de fabricación se obtienen muestras sucesivas distribuidas a lo largo del periodo en el que se realice la inspección. En la hoja anexa que acompaña a las muestras, se consignará toda la información pertinente que pueda ayudar en la dirección de su diagnóstico.

Una vez identificadas las muestras se envían al laboratorio en refrigeración utilizando para su envío hielo natural o hielo seco, en este caso es recomendable el uso de hielo contenido en bolsas de plástico para evitar el deshielo y la posible contaminación de la muestra.



MUESTRAS DE BIOLÓGICOS Y PRODUCTOS FARMACEUTICOS

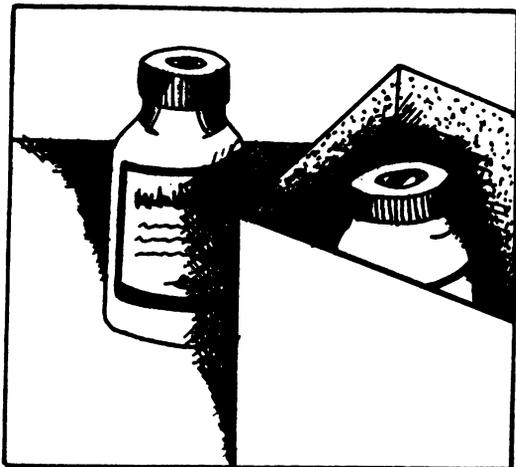
La eficiencia de los productos biológicos y farmacéuticos como vacunas, bacterinas, hormonas, vitaminas, etc. se basa en el control de calidad del producto así como en el método de conservación utilizado para su mantenimiento, ya que pueden ocurrir alteraciones durante su elaboración, conservación, transporte y uso que repercuten en forma directa en una disminución del efecto deseado.

Es frecuente encontrar contaminaciones de viales y del producto mismo, por lo que es necesario realizar un análisis cuando se sospecha de estos productos.

Alimento procesado que puede ser remitido para su examen en el laboratorio.



En el caso de vacunas y bacterinas, se debe enviar el vial y el diluyente sin reconstituir por duplicado o bien remitir en frasco completo sin abrir y del mismo lote. La hoja clínica debe especificar detalles como: casa comercial, No. de lote, distribuidora comercial. Las muestras se envían en refrigeración.



Muestras de biológico debe utilizarse hielo natural como conservador para su envío al laboratorio.

Una vez presentada la manera idónea de recolectar y enviar una muestra se está en condiciones de poder tomar decisiones de qué pedir al laboratorio para poder confirmar un diagnóstico en el caso de enfermedades causadas por bacterias y hongos o bien, a falta de un laboratorio.

El Médico clínico de campo puede trabajar las muestras según las técnicas que se describen en los siguientes capítulos y poder establecer la causa de la enfermedad.

TOMA DE MUESTRAS DE VESICULARES .-

Es muy necesario que sea el Médico Veterinario quién tome la muestra.

Para obtener un diagnóstico rápido, las muestras deben ser de buena calidad, tales como epitelios linguales frescos.

Son muestras de mala calidad los epitelios gingivales pezuñas, ubres, también cuando proceden de lesiones cicatrizadas.

Se debe utilizar material totalmente esterilizados como tijeras rectas de punta roma, pinzas de caucho, frascos estériles con glicerina buferada al 50% graza y trapos y gaza estériles.

Sujetar debidamente el animal inmovilizándolo para manipular la cabeza.

Examinar la boca, lengua utilizando un trapo para sostener la lengua o gaza estéril.

Elegir la vesícula de mayor tamaño, sostenerla y luego perforarlas con tijeras levantando los bordes de las heridas con la ayuda de una pinza.

Extraer así las muestras del epitelio en cantidad superior a 2 - gramos y depositar dentro de los frascos.

Sellarlos con un esparadrapo y marcarlo con el nombre del animal o número, además fecha de la toma de la muestra utilizando el formulario de remisión.

Utilizar un frasco para cada muestra de un animal afectado

Proteger el frasco con la muestra con el material de protección para evitar que no se rompa durante el transporte.

Llenar correctamente el formulario cumpliendo los detalles solicitados en ellos.

Avisar telefónicamente a los laboratorios de diagnósticos el envío de la muestra, indicando número de guía, hora de envío, fecha etc.

Mantener en refrigeración la muestra hasta el envío al laboratorio ; enviarla con hielo dentro de fundas plásticas.

terminar el trabajo de la toma de muestra, hacer que el personal que participó se lave cuidadosamente las manos con agua y jabón (desinfectante) solución de carbonato de sodio al 4%.

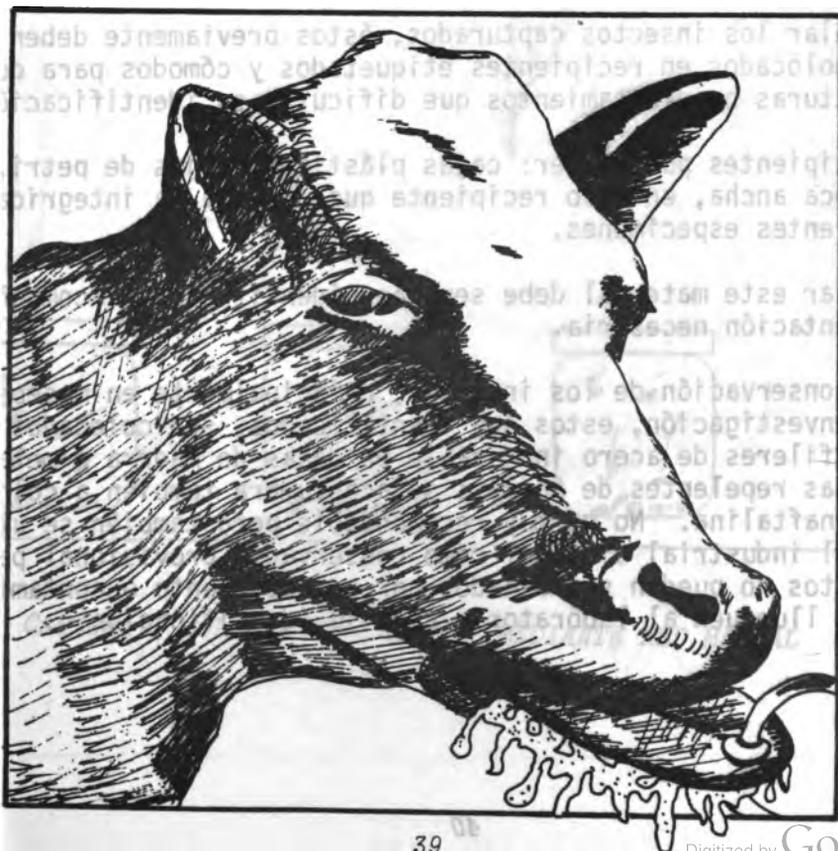
Antes de salir del medio desinfectar los zapatos y el equipo utilizado, llantas y la parte baja del vehículo.

Cuando no sea posible el envío de epitelio, se puede recurrir a la toma de muestra en líquido en líquido extractores-faríngeos (E.F.) - para lo cual se utilizan extractores especiales (Proboan).

El diagnóstico diferencial es imprescindible para conocer si es aftosa o estomatitis vesicular.

Normalmente el laboratorio puede dar los resultados.

Con muestras de buena calidad se puede obtener la identificación rápida de los virus de fiebre aftosa mediante la prueba de fijación de complemento.



COLECTA DE INSECTOS

Para la colecta de insectos podemos utilizar dos métodos principales mediante trampas y red entomológica manual.

El Proyecto Estudio Bioecológico de la *Dermatobia hominis* (nuche, pe) que ejecuta el Programa Nacional de Sanidad Animal, tiene sus Centros de Observación en Mera y El Carmen, donde se utiliza la trampa malaise, que es una especie de carpa de campaña hecha de tela tul y de con frascos colectores en donde los insectos son asfixiados y muertos con cianuro.

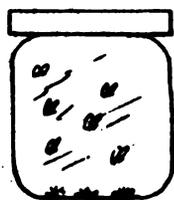
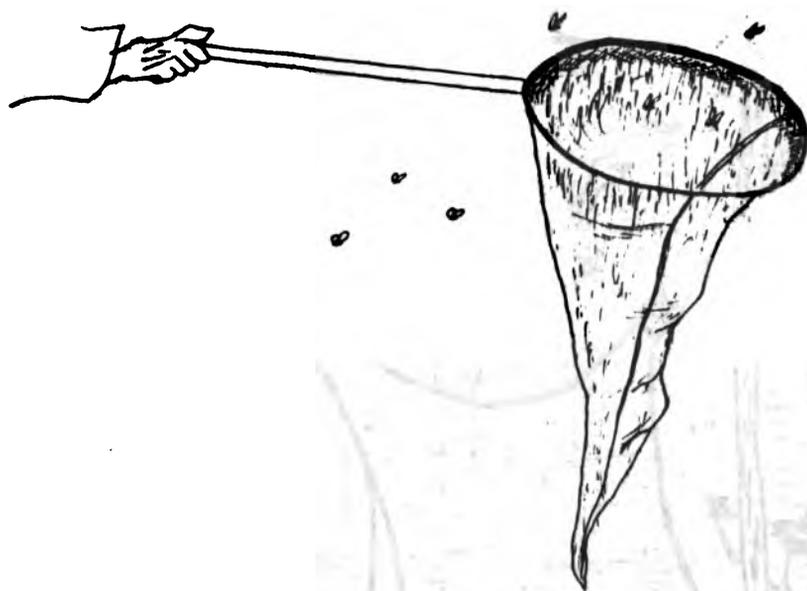
La red entomológica, no es más que un aro de metal de unos 40 centímetros de diámetro forrado de tela en forma de embudo o filtro de café, la cual es manejada manualmente sobre el ganado; una vez capturados los insectos en la red, estos son llevados a frascos conteniendo gas de acetato de etilo o cianuro donde mueren.

Para embalar los insectos capturados, éstos previamente deben ser cuidados y colocados en recipientes etiquetados y cómodos para que no sufran fracturas o aplastamientos que dificulte su identificación.

Estos recipientes pueden ser: cajas plásticas, cajas de petri, frascos de boca ancha, en otro recipiente que proteja la integridad de los diferentes especímenes.

Para enviar este material debe ser bien identificado y acompañado de la documentación necesaria.

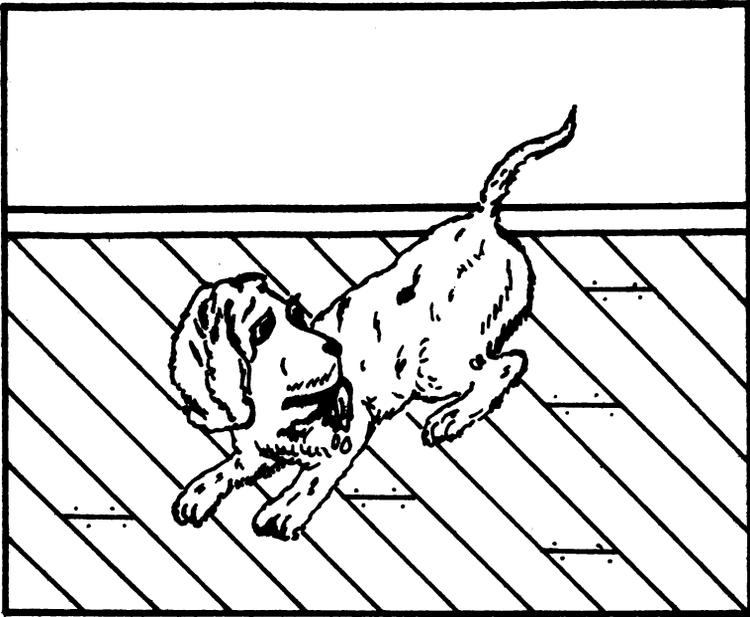
Para la conservación de los insectos, principalmente en museos o centros de investigación, estos son identificados, son colocados por medio de alfileres de acero inoxidable en cajas de madera o metal con sustancias repelentes de ácaros; se acostumbra también a colocar litas de naftalina. No es muy recomendable pero también se utiliza el alcohol industrial o etanol como conservador provisional para que los insectos no puedan ser dañados por aplastamiento o contaminación hasta que lleguen al laboratorio para su identificación.



CAPTURA Y COLECTA DE INSECTOS MEDIANTE RED MANUAL.



R A B I A



ENVIO DE MUESTRAS PARA DIAGNOSTICO DE RABIA

Todo animal sospechoso de padecer la RABIA debe ser capturado y mantenido en observación, por lo menos durante diez días, dejando que la enfermedad evolucione hasta la muerte.

El sacrificio prematuro de los animales disminuye la precisión del diagnóstico de laboratorio, ya que los corpúsculos de Negri se desarrollan en el tejido del cerebro en relación directa con la duración del proceso clínico de la RABIA.

Si por alguna causa especial se tuviese que sacrificar al animal, se lo matará preferentemente de un tiro al corazón, pues un disparo en la cabeza lesionaría el encéfalo y reduciría su utilidad para el diagnóstico. No es recomendable el empleo de venenos o químicos, ya que posteriormente pueden causar dificultades en las pruebas de inoculación a animales (diagnóstico biológico).

EMPAQUETADO Y ENVIO DE LA MUESTRA

Una vez decapitado el animal, a la cabeza se la debe enfriar con rapidez y se la mantendrá a baja temperatura, siendo preferible enviarla al Laboratorio con un mensajero, pero si esto no es posible, se empaquetarla para su EXPEDICIÓN URGENTE POR VIA TERRESTRE O AEREA. Para el efecto se pone la cabeza en una lata o en otro recipiente metálico impermeable, adecuado, se lo cierra herméticamente y se lo coloca a su vez, dentro de un envase metálico impermeable de mayor tamaño, llenando con hielo machacado el espacio que queda entre los dos recipientes. El paquete se rotula con claridad y se envía al laboratorio con la máxima urgencia. En la etiqueta se lee: ATENCION, ESTE PAQUETE CONTIENE LA CABEZA DE UN PERRO SOSPECHOSO DE HABER MUERTO POR RABIA. Así mismo pueden utilizarse fundas de plástico grueso y una caja de cartón. Se debe emplear una



funda interior gruesa de un tamaño de unos 45 cm., por unos 100 cm., y forma que tenga profundidad suficiente para que el extremo abierto se pueda retorcer y anudar firmemente una vez colocada la muestra en el interior. Si la cabeza tiene aristas o salientes agudas, como huesos astillados, se debe envolver primero en varias hojas de papel periódico y colocar después en la funda.

La funda interna anudada que contiene la cabeza, se introduce después en otra interior mayor, de doble pared, llena de trozos de hielo hasta un tercio de su volumen. La cubierta doble exterior está formado por dos sacos de plástico, uno dentro de otro, de unos 60 cm., de anchura y 120 cm., de profundidad. Se agrega después más hielo triturado hasta recubrir el envase de la muestra y a continuación se cierre herméticamente el saco exterior doble, de mayor tamaño retorciendo y anudando el extremo abierto. Se introduce todo el paquete en una caja de cartón y se cierra con todo cuidado utilizando cinta de plástico adhesiva, para asegurarse de que los bordes de las cubiertas superiores e inferiores de la caja queden perfectamente cerrados.

Aunque con la congelación de la muestra y su envío en recipiente de nieve carbónica, (dióxido de carbono sólido) o de nitrógeno se conserva el virus, no se puede hacer un examen microscópico rápido a causa del tiempo necesario para la descongelación. Los fragmentos congelados del encéfalo se manejan en el laboratorio con más facilidad que las cabezas enteras congeladas. Inmediatamente después de la descongelación, se preparan los tejidos para el examen microscópico directo de los corpúsculos de Negri, la prueba de los anticuerpos fluorescentes o la prueba de inoculación al ratón.

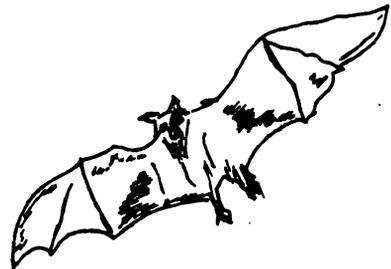
Cuando se reciben cabezas de animales para su examen de RABIA, conviene disponer de los siguientes datos: especie y raza del animal; posibles contactos con otros animales; si ha fallecido a causa de la enfermedad o ha sido sacrificado y, en este último caso de que manera; si se le ha mantenido encerrado y en observación durante un período suficiente antes de la muerte y en caso afirmativo, duración del período, síntomas de rabia, en caso de que existan; y antecedentes de vacunación antirrábica. Nombre de la hacienda, localización de la misma, nombre del propietario o interesado en el diagnóstico, dirección domiciliaria, número telefónico, nombre y dirección del profesional Médico Veterinario que ha intervenido en el caso.

EXTRACCIÓN DEL CEREBRO DEL ANIMAL .-

Deben adaptarse todas las precauciones necesarias, inclusive la aplicación de una cuidadosa técnica operatoria y la protección de las manos con guantes de autopsia de goma gruesa, para evitar la infección de las personas encargadas de abrir las cabezas de los animales.

Con un bisturí grande o un cuchillo de disección se hace un corte a lo largo de la línea media del cráneo que atraviesa la piel, las fascias y los músculos, empezando por delante inmediatamente por encima de los ojos, hasta la base del cráneo. Se separan del cráneo la piel, las fascias y los músculos temporales y se levantan lateralmente para exponer el hueso. A continuación se recorta la calota con una sierra, un escoplo de huesos o un cuchillo de carnicero. En la mayor parte de los laboratorios se prefiere la sierra con la que se cortan los dos lados del cráneo desde el agujero occipital hasta los huesos frontales. Después se unen los cortes longitudinales con una incisión transversal por la lámina del frontal, inmediatamente por encima de los ojos y se separa la calota con una pinza esterotómica y un escoplo.

El cerebro se extrae del cráneo con un nuevo juego de instrumentos estériles. Los meninges y la tienda del cerebelo que se separa el cerebro del cerebelo se disecan con unas pinzas de dientes de ratón y un bisturí o unas tijeras y se llega hasta la parte posterior del cerebro, que se separa seccionando el bulbo, los nervios craneales y la prolongación anterior del tálamo. Se saca el cerebro completo del cráneo y se deposita en una bandeja de cartón o en una placa de Petri grande.

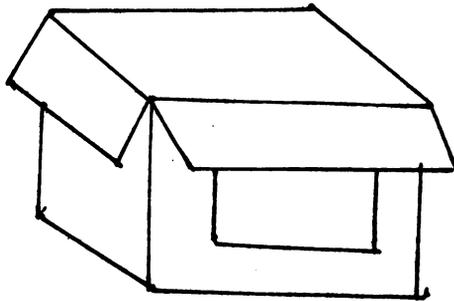
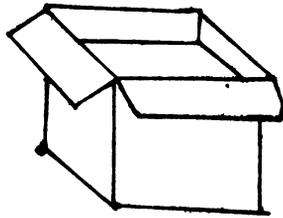
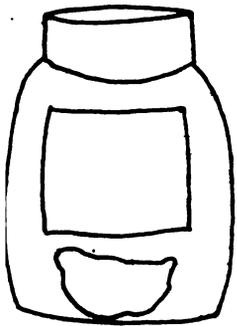


MUESTRAS GLICERINADAS .-

Previamente se separa una solución salina fisiológica estéril con glicerina al 50%, se mezclan en partes iguales glicerina químicamente pura y solución salina fisiológica. La solución se distribuye en tarros o frascos pequeños de tapón roscado y se conserva a la temperatura ambiente.

Deben tomarse trozos bastantes grandes de cerebro, por lo menos - del tamaño del cerebro de un ratón (0.3gr. o más) con objeto que el laboratorio disponga de material suficiente para el trabajo.

Entre las muestras de cerebro deben incluirse: Asta de Amón, corteza y cerebelo. Se colocan las piezas de tejidos en un frasco con la solución salina glicerinada al 50% , de esta forma el virus - rábico en caso de que exista, se conservará durante el transporte - sin necesidad de refrigeración.



CUADRO 1.8

CUADRO RESUMEN DE RECOLECCION Y ENVIO DE MUESTRAS

ENFERMEDAD	MUESTRAS	CONSERVACION	PRUEBAS DE LABORAT.
Abcesitis por clostridium.	Animal entero Sangre Abceso Abceso	Refrigeración Refrigeración Refrigeración Formal	Necropsia Hemocultivo Bacteriología Histopatología
Abceso	Feto y Placenta Suero de madre	Refrigeración Refrigeración	Necropsia, histopatológico. Aislamiento bacteriológico y micótico. Aislamiento de un virus y serología.
Abceso	Exudado	Refrigeración	Aislamiento bacteriológico.
Actinobacillo- y actinomycosis	Biopsia	Refrigeración Formal	Aislamiento bacteriológico. Histopatológico.
Antrax	Porción de oreja Frotis sanguíneo Sangre Líquido de esema	Refrigeración en recipiente sellado y rotulado. Ch Metílico Anticoagulante Refrigeración	Aislam. Bacteriológ. Microscopia Inoculación en Microscopia
Artritis	Animal entero y vivo, líquido articular y toncillas.	Refrigeración o congelación.	Necropsia, histopatológico. Aislamiento bacteriológico.
Aspergilosis	Animal entero Organo afectado Pulmones Feto y placenta	Refrigeración Refrigeración Refrigeración Refrigeración	Necropsia, histopat. Cultivo y aislamiento micótico. Histopatología Aislamiento micótico
Blastomicosis	Tejido afectado	Formal	Histopatología

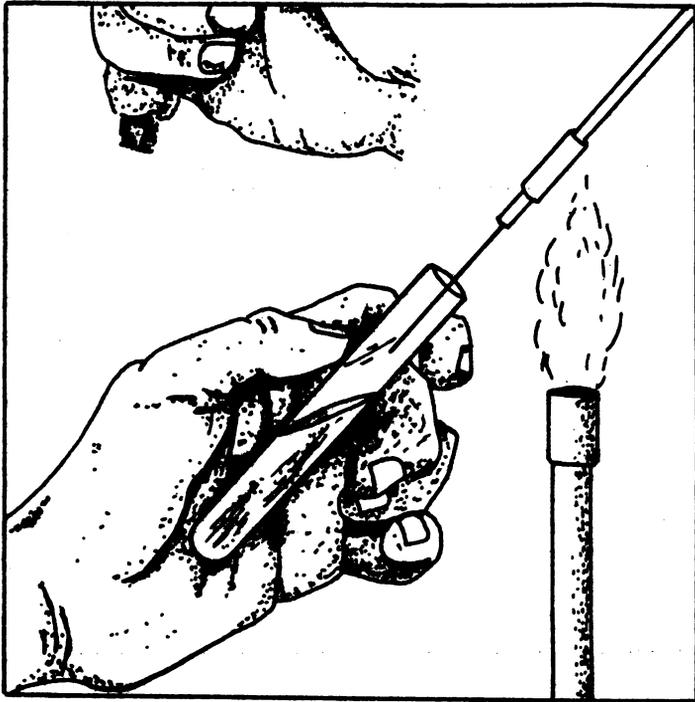
ENFERMEDAD	MUESTRAS	CONSERVACION	PRUEBAS DE LABORATORIO
Botulismo	Contenido intestinal y estomacal. Sangre	Refrigeración Anticoagulante Refrigeración	Aislamiento bacteriológico. Inoculación a pavos.
Brucelosis	Semen, exudado vaginal. Abomaso, pulmón Suero Feto y placenta	Refrigeración Refrigeración Refrigeración Refrigeración	Aislamiento bacteriol. y microscopía directa Aislamiento bacteriol. Serología Aislamiento bacteriológico.
Candidosis	Raspado cutáneo Sangre Feto y Placenta	Refrigeración Refrigeración Refrigeración Formol	Cultivo Aislamiento Microscopía directa Histopatológico
Carbunco	Animal entero Músculo	Refrigeración Formol	Necropsia, histopatología. Histopatología
Cólera Aviar	Animal entero Hígado, pulmón bazo e intestino.	Refrigeración Refrigeración Formol	Necropsia, histopatología. Aislamiento bacteriol. Histopatología.
Colibacilosis	Animal entero Intestino delgado (Duodeno) bazo, ganglios linfáticos. Sangre Heces	Refrigeración Refrigeración Formol EDTA y refrigeración. Refrigeración	Necropsia, histopatol. Aislamiento bacteriológico. Histopatología Cultivo bacteriológico. Aislamiento bacteriológico.
Coriza	Organos afectados y exudado.	Refrigeración	Aislamiento bacteriológico. Inoculación en animales.
Criptococosis	L.C.R. Sangre Pulmón, hígado Riñón Orina	Refrigeración Refrigeración y anticoagulante. Formol Refrigeración	Aislamiento micótico, microscopía directa. Frotis con tinta china. Histopatología Aislamiento micotico.

ENFERMEDAD	MUESTRAS	CONSERVACION	PRUEBAS DE LABORATORIO
Dermatitis Cutánea	Biopsia, raspado cutáneo, pelo.	Formol	Microscopía directa Cultivo.
Disentería	Animal entero y vivo. Heces	Refrigeración	Necropsia, aislamiento bacteriológico, microscopía directa.
Edema intestinal gélcoeddo.	Animal entero Encéfalo, intestino. Ganglios linfáticos. Heces	Refrigeración Refrigeración Formol	Necropsia, histopatología. Bacteriología. Histopatología
Edema maligno y pierna negra	Animal entero y líquido de edema.	Refrigeración	Necropsia, Bacteriología, y Microscopía.
Enfermedad de Glasser	Animal entero Suero	Refrigeración Refrigeración	Necropsia, histopatología. Bacteriología Serología
Enfermedad crónica respiratoria.	Organos afectados Animal entero Suero	Refrigeración Refrigeración Refrigeración	Bacteriología Necropsia Serología
Enterotoxemia	Asa intestinal y tejidos afectados	Refrigeración	Bacteriología y microscopía directa.
Erisipela	Animal entero Bazo, hígado, riñón tonsilas, ganglios linfáticos, exudado articular. Frotis sanguíneo Suero Sangre	Refrigeración Refrigeración OH metílico Refrigeración EDTA	Necropsia, histopatología. Bacteriología Microscopía directa Serología Hemocultivo
Espiroquetosis aviar.	Frotis sanguíneo Animal entero. Bazo, hígado	OH metílico Refrigeración Refrigeración	Campo obscuro Necropsia, histopatología. Bacteriología.

ENFERMEDAD	MUESTRAS	CONSERVACION	PRUEBAS DE LABORATORIO
Epidermitis exudativa	Animal entero	Refrigeración	Necropsia, histopatología.
	Piel y riñón	Refrigeración Formol	Bacteriología Histopatología
Gucma	Secreción nasal ganglios linfáticos.	Refrigeración	Bacteriología
Hemoglobinuria Bacilar	Hígado y orina Sangre	Refrigeración EDTA	Bacteriología y Micros. Hemocultivo
Leptospirosis	Espos, Suero (madre)	Refrigeración	Bacteriología
	Orina Agua de bebida	Refrigeración	Serología Campo oscuro
Linfadenitis caseosa.	Eudado	Refrigeración	Bacteriología
Listeriosis	Heces, orina	Refrigeración	Bacteriología
	Leche Suero		Serología
	Feto, placenta Encéfalo		Histopatología
	Médula	Formol	
Mastitis	Leche	Refrigeración	Bacteriología
Muermo	Ulceras	Refrigeración	Bacteriología
	Suero	Refrigeración	Serología
	Secreciones	Refrigeración	Inoculación a animales
Paratuberculosis	Animal entero	Refrigeración	Necropsia, histopatología.
	Biopsia rectal	Formol	Histopatología
	Heces	Refrigeración	Bacteriología
	Suero	Refrigeración	Serología
	Recto	Refrigeración	Microscopía directa
	Ganglios linfáticos mesentéricos, cólicos y rectales.	Formol	Histopatología
Pielonefritis Bovin	Orina	Refrigeración	Bacteriología Microscopía directa.

NOMBRES	MUESTRAS	CONSERVACION	PRUEBAS DE LABORATORIO
Queratoconjuntivitis. vitis.	Buedado conjuntival Zona afectada	Refrigeración Formol	Bacteriología Histopatología
Rinitis	Cerdo entero vivo trompa, estado nasal.		Necropsia, histopatología. Bacteriología 6
Salmonelosis	Animal entero Intestino, hígado riñón, bazo y pulmón.	Refrigeración Formol	Necropsia, Histopatología. Bacteriología Histopatología
Shigelosis	Moco cervical Animal entero Intestino, bazo, Hígado, riñón y pulmón. Heces	Refrigeración Refrigeración Formol Refrigeración	Cultivo bacteriológico Necropsia, histopatología. Aislamiento bacteriológico. Histopatología Cultivo Bacteriológico
Tétanos	Suero Heridas	Refrigeración Refrigeración	Inoculación a animales Bacteriología
Tuberculosis	Tejidos afectados Secreciones, esputo Suero	Refrigeración Formol Refrigeración Refrigeración	Microscopía directa Bacteriología Histopatología Inoculación a caballo Serología
⁴ Tularemia	Animal entero Hígado y otros órganos afectados Suero	Refrigeración Refrigeración Refrigeración	Necropsia, histopatología. Aislamiento bacteriológico. Serología
Vibriosis	Suero Sémen, moco vaginal. Feto y Placenta	Refrigeración	Serología Bacteriología Necropsia, histopatología. Bacteriología.

BACTERIOLOGIA



BACTERIOLOGIA .-

Durante los últimos años el área de la bacteriología diagnóstica ha demostrado avances considerables en la rama de la Medicina Veterinaria, esto ha permitido que el diagnóstico de las enfermedades infecciosas que afectan a los animales se realice de una forma rápida y precisa.

Por mucho tiempo el área de diagnóstico se mantuvo distanciada de las prácticas de bacteriología. Actualmente debido a las necesidades de incrementar la producción animal en México, se hace indispensable que el Médico Veterinario posea un conocimiento básico de los principios y técnicas utilizadas en el laboratorio de Microbiología.

Para poder actuar ante un caso de enfermedad infecciosa, el Médico debe saber que organismo específico es el agente casual (agente etiológico) por tanto para diagnosticar estas enfermedades es necesario aislar e identificar al microorganismo responsable de la infección.

Continuamente se desarrollan métodos y técnicas mejoradas para el aislamiento y la identificación de los microorganismos, en algunos casos es posible realizar una identificación tentativa de un organismo por demostración directa mediante un estudio microscópico, pero en la mayoría de los casos es necesario realizar un cultivo en un medio artificial bajo condiciones ambientales que sean adecuadas para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo el tipo de organismo que más se sospecha de acuerdo a la naturaleza y el origen del material que se vaya a examinar así como de los datos aportados por el Médico Clínico.

Este capítulo está planteado de manera que cualquier persona con los conocimientos básicos de laboratorio pueda demostrar, aislar e identificar en forma rápida y sencilla la mayoría de bacterias que causan enfermedad a los animales y al hombre para que una vez logrado lo anterior pueda llevar a cabo pruebas in vitro de sensibilidad a los antimicrobianos y así poder establecer un posible esquema terapéutico.

El propósito de esta sección de diagnóstico es el de informar al estudiante de Medicina Veterinaria de los principios, técnicas - y evaluación del diagnóstico de laboratorio de las enfermedades bacterianas, basándose en los 3 aspectos básicos en el diagnóstico microbiológico.

- a) Demostración
- b) Aislamiento
- c) Identificación

Se debe tener en cuenta por el estudiante que esta sección es el complemento o aplicación de sus conocimientos en el área de la bacteriología general y una base en sus próximos estudios de las enfermedades infecciosas y clínicas en las diferentes especies domésticas.

a) Demostración :

Tiene por objeto la visualización del agente patógeno o su efecto en el material biológico al laboratorio de diagnóstico, la demostración puede realizarse mediante el examen directo de una extensión sin teñir o bien utilizando colorantes específicos.

Ventajas .-

- Se obtienen resultados inmediatos
- Requerimientos mínimos de equipo, tiempo, técnicas de laboratorio, espacio de trabajo, etc.
- Puede ser el único método de diagnóstico probable como en el caso de que el microorganismo problema no pueda ser cultivado in vitro o poseer características de cultivo especiales.
- Nos puede orientar tentativamente a un diagnóstico y tratamiento rápidos.
- Nos puede dar una idea de la cantidad de gérmenes relacionados en el proceso infeccioso (forma, tamaño y disposición).
- Nos muestra sus características de tinción.

Limitaciones .-

- Se requiere la presencia de grandes cantidades de microorganismos para la obtención de resultados positivos.
Se calcula que aproximadamente por cada bacteria que se observa al microscopio con el objetivo de inmersión existen 10⁶ bacterias por ml. o gramo de muestra.
- En la mayoría de los casos no proporciona respuesta de la

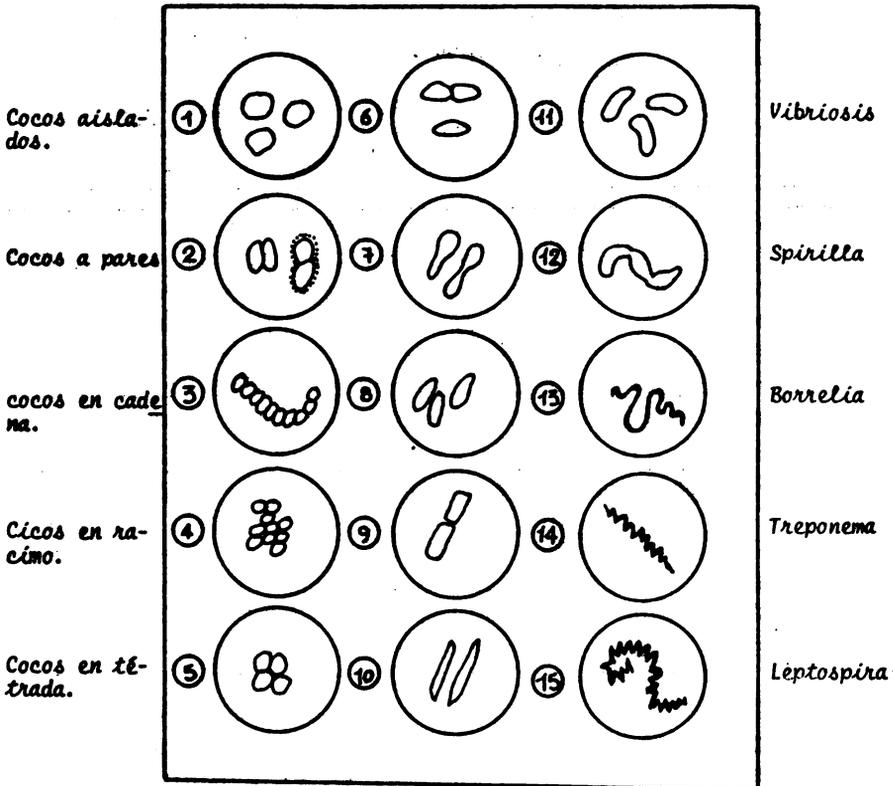
acción de toxinas, anticuerpos, etc. relacionados con el proceso in vitro. Respuesta más específica se puede obtener con el uso de anticuerpos marcados (fluorescencia, ferritina, enzimas, etc). o utilizando microscopía de campo oscuro.

CLASIFICACIÓN MORFOLOGICA DE LAS BACTERIAS .-

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas, sin embargo el desarrollo de la microbiología se ha conseguido mediante el estudio de especies aisladas desarrolladas en medios desprovistos de organismos contaminantes.

Morfológicamente, las bacterias se clasifican dentro de los siguientes grupos: cocos, los cuales cuando están totalmente desarrollados libres son perfectamente esféricos; cuando dos o más están en oposición pueden ser ligeramente aplanados a lo largo de la superficie de contacto, tomando aspecto oval, bacilos, son bastones rectos cuya longitud es de dos a diez veces su anchura, con los extremos algo redondeados, como en la Salmonella typhi o cortados en esquadra, como el Bacillus anthracis, los vibrios, son pequeños organismos que adoptan una forma de goma (como una sola curva) los espirilos, son de forma más larga y sinuosas de cuatro a veinte curvas con apariencia de un sacacorcho animado.

COCOS	BACILLOS		VIBRIOS ESPIROQUETAS
	no forman esporas	formadoras de esporas.	
Staphylococcus	E. coli	Clostridium	Treponema
Streptococcus	Brucella	B. anthracis	Leptospira
Gonococo	Shigella		Borrelia
Meningococo	Salmonella		Vibrio



Morfología bacteriana

- 6. Cocobacilos
- 7. Bacilos en forma de clava o maza
- 8. Bacilos con extremos redondeados
- 9. Bacilos con extremos cortados en escuadra
- 10. Bacilos fusiformes

OBSERVACION DE MICROORGANISMOS VIVOS SIN TENIR , -

Los microorganismos se encuentran en su estado más característico y natural en los cultivos jóvenes y en preparaciones frescas no teñidas, observándose mejor por microscopía de contraste de fase y campo oscuro. Tal examen podrá demostrar no sólo la forma o formas de los microorganismos sino que además, si tiene o no movimientos propios.

La mayoría de los microorganismos aparecen incoloros cuando se les observa in vivo aunque existen algunos que presentan pigmentos como en el caso de las algas fotosintéticas que poseen clorofila. Utilizando el objetivo de inmersión del microscopio es posible descubrir detalles estructurales internos en las células más grandes pero es prácticamente imposible en organismos tan pequeños como las bacterias, esto se debe parcialmente a que el poder de resolución del microscopio de campo claro no alcanza a poner de manifiesto estructuras más pequeñas de 0.2 micrómetros y también a que el citoplasma tiene un índice de refracción de la luz mas bajo por lo que la observación de microorganismos resulta difícil cuando no se tiñen.

La observación de microorganismos vivos se puede realizar satisfactoriamente, utilizando preparaciones húmedas (como la gota suspendida o utilizando portaobjetos excavados) las cuales son fáciles de montar y requieren de un mínimo de material.

La técnica puede realizarse de la siguiente manera: a) se deposita una delgada capa de vaselina alrededor del borde de la depresión en el portaobjetos excavado, b) en el centro del portaobjetos se coloca una asa una gotita de la suspensión de la bacteria; c) se toma el portaobjetos cóncavo invertido y se presiona firmemente contra el cubreobjetos y, d) con gran rapidez se vuelve a voltear toda la preparación y se observa.

TECNICAS DE TINCION .-

Los colorantes se combinan químicamente con el protoplasma bacteriano, si la célula no ha muerto el proceso mismo de la tinción la mata. Los colorantes comunmente usados son sales, una sal es un compuesto formado por un ion cargado negativamente, las células bacterianas son ricas en ácidos nucleicos los cuales portan cargas negativas en forma de grupo fosfato, éstos se combinan con los colorantes básicos cargados positivamente lo cual les hace ser más utilizados en citología bacteriana; los colorantes ácidos no tienen la célula bacteriana y por lo tanto, pueden ser usados para impartir al fondo un color de contraste por ejemplo 54, 34.

En colorante simple azul de metileno es la sal cloruro de azul de metileno que se disocia de la siguiente manera:

CAM -----Cloruro + Azul de metileno

El colorante que se adquiere reside en el ion azul de metileno cargado positivamente.

Las células bacterianas tienen una débil carga negativa cuando el PH del medio extremo está cerca de la neutralidad que es lo que generalmente ocurre, la célula bacteriana cargada negativamente se combina con el ion azul de metileno cargado positivamente con lo cual se tiñe la bacteria, las diferencias en la carga dan lugar a una afinidad entre el colorante y la célula bacteriana.

Para los estudios bacteriológicos existen varios métodos de tinción, las ventajas que ofrece el uso de las tinciones en la identificación bacteriana son: a) el proporcionar contraste entre el microorganismo y el medio que le rodea, permitiendo llevar a cabo la diferenciación entre los distintos tipos morfológicos, b) - permite el estudio de estructuras internas de la célula bacteriana tales como paredes celulares, vacuolas o cuerpos nucleares; - c) permiten al bacteriólogo emplear mayores ampliificaciones.

La amplia gama de colorantes de que dispone actualmente el bacteriólogo se emplean en métodos que son modificaciones de las técnicas de tinción básicas.

CLASIFICACION DE LAS TINCIONES

1. TINCIÓN SIMPLE

- a) *Colorantes básicos*
- b) *Colorantes ácidos*
- c) *Colorantes indiferentes*

2. TINIONES DIFERENCIALES

- a) *Tinción de Gram*
- b) *Tinción de ácido-resistentes*

3. TINIONES ESTRUCTURALES

- a) *Tinción de Fielgen*
- b) *Tinción de endosporas*
- c) *Tinción de pared celular*
- d) *Tinción de flagelos*
- e) *Tinción de cápsulas*

PREPARACION DE UN FROTIS FIJO PARA TINCION

Antes de teñir se debe "fijar" el material que se va a observar, los portaobjetos que se empleen para realizar las extensiones deben estar limpios y bien marcados para su identificación y para la delineación del área en que hay que colocar la muestra, el portaobjetos puede dividirse en varias secciones con un lápiz - marcador y colocarse varias extensiones en una misma placa a condición de que todas se vayan a teñir de la misma manera.

Procedimiento .-

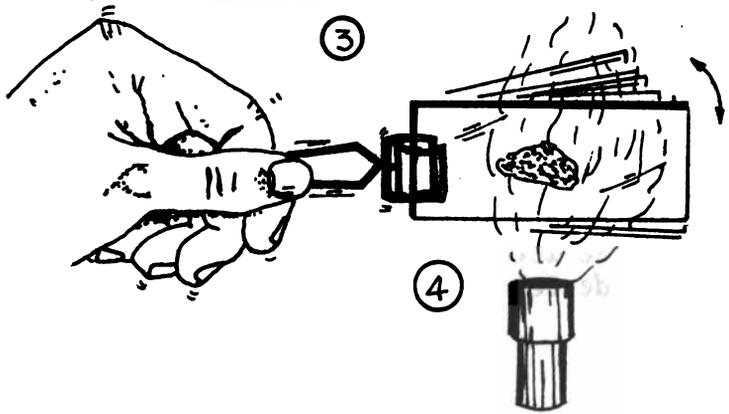
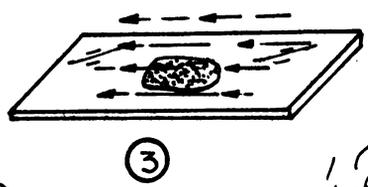
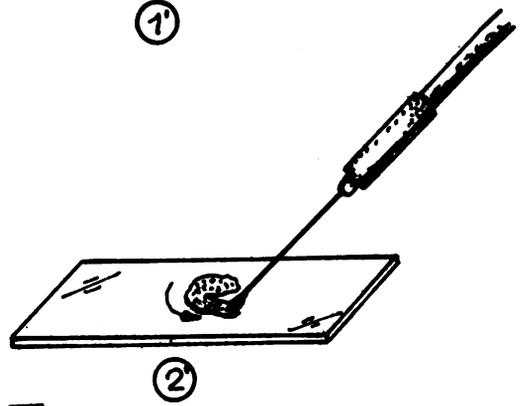
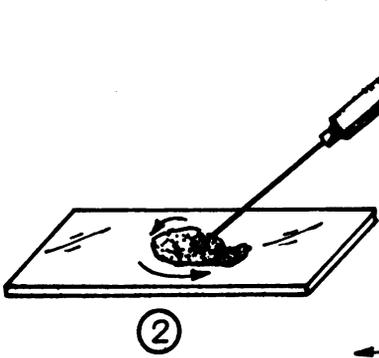
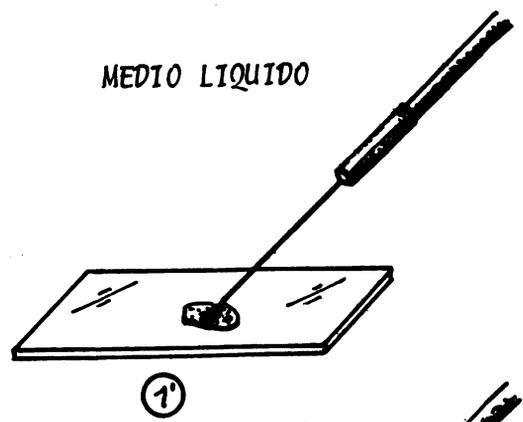
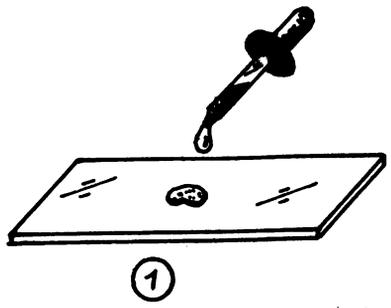
La técnica para realizar el frotis bacteriano es variable si el cultivo se encuentra en medio sólido o en líquido. Con un asa de inoculación se coloca una gota pequeña del cultivo que se va a teñir si esta proviene de un medio líquido cuando se toma a partir de un cultivo sólido se coloca una gota de agua destilada en el portaobjetos y se mezcla bien con un poco del crecimiento del cultivo.

- Extender la gota sobre el portaobjetos formando una capa fina, debe evitarse preparar un frotis demasiado grueso.
- Seque los portaobjetos al aire o manteniéndolos sobre la llama del Bunsen.
- Cuando se haya secado el frotis, pase el portaobjetos tres veces por la llama del mechero con la capa hacia arriba; teniendo cuidado de no aplicar el calor en forma excesiva ya que esto estropearía la morfología normal y la estructura de los microorganismos que se van a teñir.

Aunque la fijación hecha de esta manera es buena para el trabajo corriente no es la mejor, ya que la aplicación del calor no se puede precisar con exactitud. Se pueden emplear otros métodos como la inmersión de las maminitas en alcohol etílico, formol, solución acuosa saturada de bicloruro de mercurio, líquido de Zenker y ácido acético si se utilizan fijadores químicos deben eliminarse con agua antes de teñir.

MEDIO SOLIDO

MEDIO LIQUIDO



Preparación de un frotis fijo de tinción

ACIONES SIMPLES .-

Los colorantes utilizados para tinción de las bacterias son en su mayoría colorantes básicos de anilina, tales como azul de metileno, violeta de genciana y fucsina, para tinción simple suelen emplearse solución acuosa al 5% preparada generalmente a partir de soluciones alcohólicas saturadas filtradas; la tinción se logra cubriendo película bacteriana fijada con solución colorante y dejándola actuar de 1/2 a 1 1/2 minutos, según la fuerza del colorante empleado; el azul de metileno es el más débil de los tres colorantes mencionados; el violeta de genciana, el más fuerte.

El exceso de colorante se quita lavando con agua dejando secar a medio ambiente. Las preparaciones teñidas se examinan directamente; no es necesario el uso de cubreobjetos.

ACIONES DIFERENCIALES .-

Tinción de Gram .-

En 1884 un médico danés, Christian Gram desarrolló un método de tinción que lleva su nombre y que es de enorme utilidad en cualquier laboratorio de bacteriología.

La tinción por el método de Gram es la más apropiada para conseguir información de valor y debe hacerse en todos los casos en que esté indicada la tinción; se emplea también como método habitual para el examen de cultivos a fin de determinar su pureza y con fines de identificación. Esta técnica proporciona información sobre propiedades estructurales de las bacterias que permiten separarlas en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas.

Los cultivos utilizados para ser teñidos por el método de Gram deben ser jóvenes es decir, deben haber sido incubados por un corto tiempo (máximo 24 horas) ya que en los cultivos viejos hay liberación de enzimas por autólisis, las enzimas atacan la pared celular y modifican sus propiedades estructurales convirtiendo así gérmenes Gram positivos en Gram negativos.

Se ha ideado muchas fórmulas y procedimientos para la tinción de Gram, las bases químicas de la coloración de Gram han sido revisadas recientemente por Dubos, Bartholomew y Mittwer, Preston y Morrel (1962).

MODIFICACION DE HUCKER

En los Estados Unidos el método aplicado es, en ocasiones referido como la modificación de Hucker (Hucker y Conn 1923) y en Inglaterra como la modificación de Lillie (1928).

PASO	METODOS	RESULTADOS	
		Gram +	Gram -
Tinción inicial	Cristal violeta durante 30 segundos.	Violeta	Violeta
Mordiente	Aplicar lugol durante 30 segundos.	Violeta	Violeta
Decoloración	Solución de alcohol y acetona gotas 3 a 5 sg.	Violeta	Se decolora
Contraste	Safranina durante 30 sg.	Violeta	Se tiñen rojo.

Escasos microorganismos Gram negativos no se tiñen bien con la safranina, ejemplos son: Haemophilus influenzae y Yersinia pestis. Los frotis de estos microorganismos deberán ser contrastados utilizando Puscina fenicada débil durante 30 segundos.

Toda la laminilla deberá estar cubierta con cada reactivo y el reactivo anterior deberá ser completamente eliminado en cada etapa, cantidad insuficiente del reactivo dará tinción o decoloración deficiente.

Los microorganismos Gram positivos se tiñen de azul y los Gram negativos de rojo.

TINCIÓN DE GIEMSA :

Estas tinción y otras (Gridley, Tinción de PAS, o la técnica de Gomori-plata metenamina) son utilizadas en la demostración de Histoplasma capsulatum en las células retículo endoteliales.

REACTIVOS :

Solución A:	Colorante de Giemsa	
	Polvo de colorante de Giemsa	600.0 mg.
	Alcohol metílico (absoluto)	50.0 ml.
	Glicerina (neutra)	50.0 ml.

Moler el colorante en un mortero, añadir la glicerina y moler de nuevo, pasar a un frasco color ámbar, añadir el alcohol y mezclar vigorosamente .

Solución B:	Solución tamponada de Wright (ph 7.0)	
	Fosfato Monopotásico.....	6.77 g.
	Fosfato de Sodio (dibásico)....	2.59 g.
	Agua destilada	1000 ml.

Solución C:	Solución colorante	
	Colorante de Giemsa	2 ml.
	Solución Buffer	6 ml.

PROCEDIMIENTO :

Fijar el frotis con alcohol metílico al 100% durante 3-5 minutos. Una técnica más exigente requiere una fijación con vapores de Tetróxido de Osmio al 2% por 20-30 minutos.

Sumergir en líquido de Giemsa diluido (se recomienda una parte de colorante en 19 partes de solución tamponada de Wright) durante 15 minutos.

Lavar con agua destilada

Secar el aire o utilizar papel secante

SOLUCIONES

- Cristal violeta con oxalato amónico

Solución A:

Cristal violeta (garantizado)	2 g.
Alcohol etílico (al 95%)	20 ml.

Solución B:

Oxalato amónico	0.8 g.
Agua destilada	80 ml.

Mezclar las soluciones A y B almacenar durante 24 horas y filtrar a través de papel.

- Solución de yodo (Mordiente)

Yodo	1 g.
Yoduro potásico	2 g.
Agua destilada	300 ml.

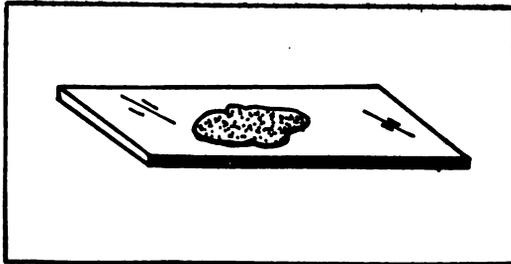
Triturar en un mortero el yodo y el yoduro potásico y añadir algunos mililitros de agua poco a poco hasta conseguir su disolución. Almacenar en un recipiente opaco.

- Coloración de contraste

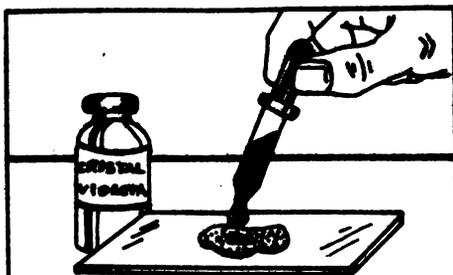
Safranina o (Solución al 2.5% en alcohol etílico al 95%)	10 ml.
Agua destilada	100 ml.

PROCEDIMIENTO

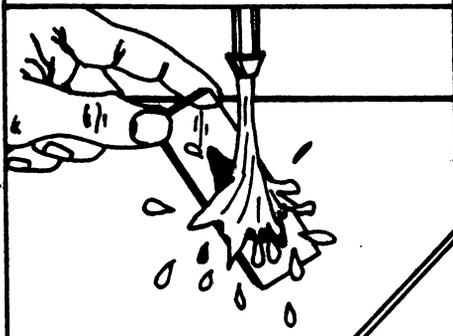
- Preparar un frotis fijo para tinción de un cultivo de 18 a 24 horas.



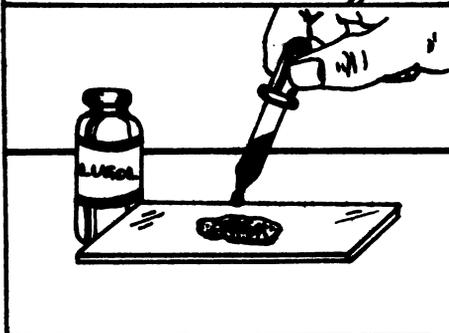
Aplicar la solución de oxalato de amonio- cristal violeta durante 30 segundos.



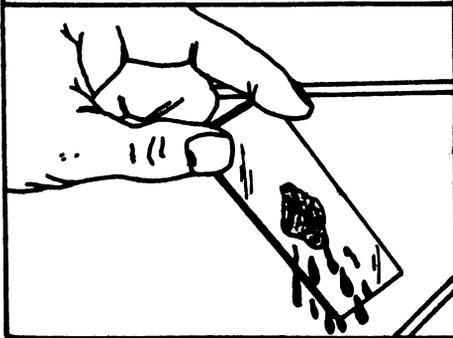
Lavar perfectamente con agua de la llave.



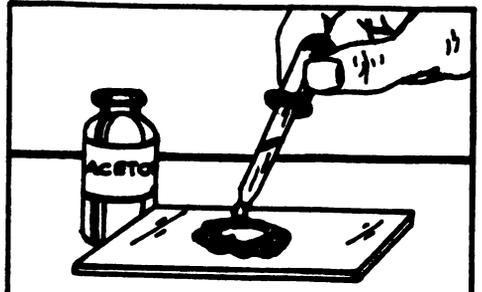
Aplicar la solución de lugol por 30 segundos.



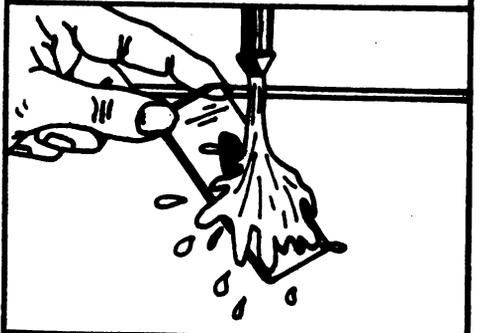
Ecurrir la solución de lugol pero no lavar.



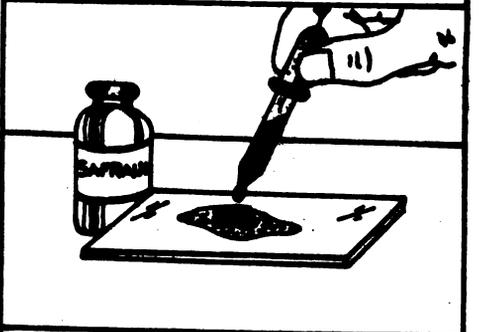
Decolorar con algunas gotas de acetona. (La acetona no deberá permanecer por más de 2 a 4 segundos).



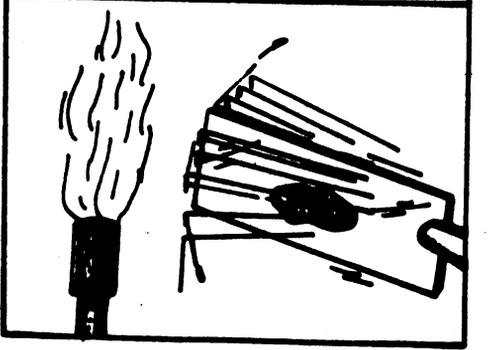
Lavar rápidamente con agua



Contrastar con safranina al 0.5% por 30 segundos.



Lavar y mantener por un extremo para escurrir o secar al mechero.



TINCIÓN DE ÁCIDO RESISTENTES. -

La tinción de ácido resistentes es una técnica diferencial que de muestra la resistencia de una célula teñida a ser colocada por los ácidos. En algunas micobacterias y actinomicetos, la propiedad de ácido resistencia está relacionada con su alto contenido en lípidos por lo tanto, la tinción de estas bacterias se debe realizar con colorantes que presenten mucha afinidad para tales células y utilizando una fuente de vapor.

Al grupo de bacterias que presentan estas características se les denomina ácido alcohol resistentes. El grupo está compuesto por bacterias del género Mycobacterium incluyendo al bacilo tuberculoso al de la lepra y al de la enfermedad de Johne o paratuberculosis del ganado; también por las especies saprófitas como el Mycobacterium pliei presente en el suelo y polvo y por algunos actinomicetos, los cuales son bacterias que guardan similitud morfológica con los hongos, el género Nocardia es un ejemplo de actinomicetos.

En este método se tiñe con fuscina fenicada, se decolora con una solución de ácido-alcohol y se da contraste a las células bacterianas, las bacterias ácido resistentes se decoloran más lentamente por el ácido-alcohol que otros organismos y retienen el color de la tinción inicial de contrastar.

Se ha definido varios métodos de tinción en frío pero tienen poca o ninguna ventaja sobre el método convencional de Ziehl-Neelsen cuando se aplican a cultivos puros.

METODO DE ZIEHL-NEELSEN [1883]

Colorante primario: Fuscina fenicada:

Fuscina básica	3 g.
Alcohol etílico al 95%	100 ml.
Fenol al 5%	900 ml.

Decolorante-Alcohol ácido:

ácido clorhídrico	3 ml.
Alcohol al 95%	97 ml.

Colorante de contraste:

solución A:

Azul de metileno (90% contenido de colorante)	03 g.
Alcohol etílico al 95%	30 ml.

Solución B:

Hidróxido de potasio
Agua destilada

0,01 g.
100 ml.

Mezclar las soluciones A y B. Algunos autores prefieren la solución acuosa de verde de malaquita al 0,5% o solución de ácido pícrico como colorante de contraste.

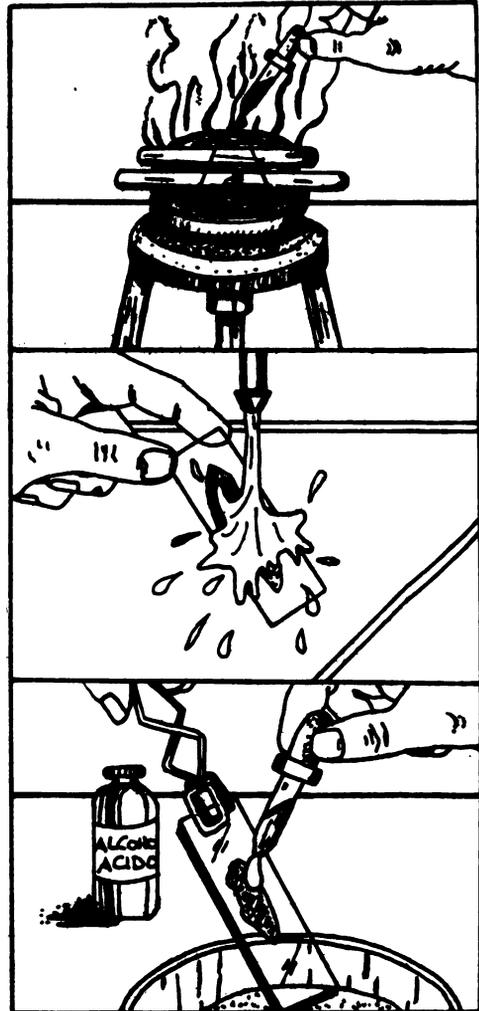
PROCEDIMIENTO. -

Preparar un frotis fijo para tinción, cubrir la laminilla con solución fuerte de fuscina fenicada y calentar hasta que se desprenda vapor (pero no hervir).

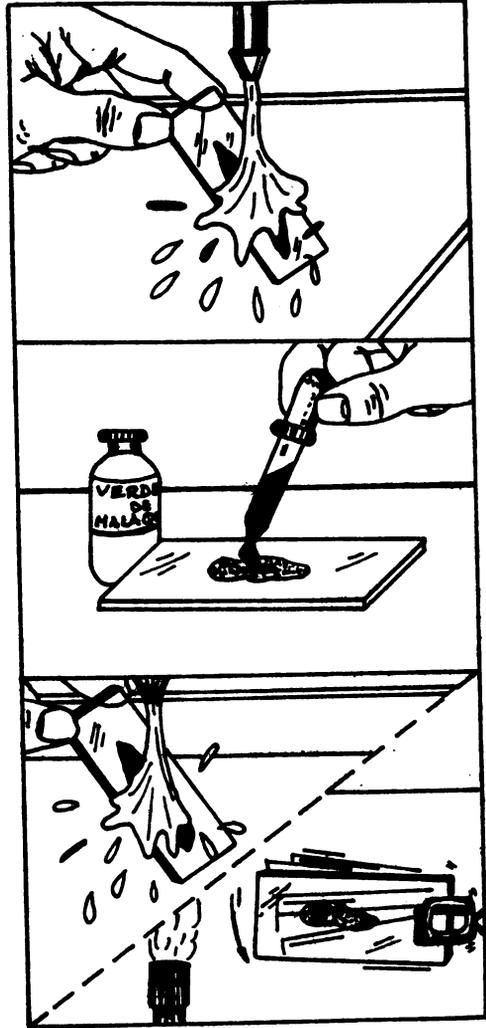
Después de 3 o 4 minutos aplicar más calor, no dejar secar el colorante en la laminilla (utilizar un trozo de papel absorbente sobre el frotis).

Aproximadamente 5 a 7 minutos después de la primera aplicación de calor, lavar perfectamente la laminilla con agua corriente.

Decolorar con alcohol ácido hasta que todas las trazas de color rojo desaparezcan del frotis. Deberán realizarse lavados intermitentes con agua y alcohol y ácido.



Lavar perfectamente con agua de la llave cuando la decoloración se haya completado.



Contrastar con azul de metileno o verde de malaquita al 0.5% durante un minuto.

Lavar y dejar escurrir sosteniendo por un extremo la lamina, no utilizar papel secante.

RESULTADO

Los microorganismos ácido resistentes se tiñen de rojo, otros microorganismos se tiñen de azul o verde según el colorante de contraste utilizado.

METODO DE KIHYOUN .-

Es un método empleado para la identificación de microbacterias que no requiere la aplicación de calor.

SOLUCIONES :

Fuscina fenicada

Fuscina básica	4.0 g.
Fenol en cristales	8.0 g.
Alcohol (95%)	20.0 g.
Agua destilada	100.0 ml.

Decolorantes

Ac. sulfúrico sol. acuosa
al 1%.

Azul de metileno

Azul de metileno	0.0 g.
Agua destilada	100.0 ml.

PROCEDIMIENTO :

Cubrir el frotis con fuscina fenicada por 3 minutos
Lavar con agua corriente y decolorar con ácido sulfúrico-
hasta que desaparezca el exceso de colorante.
Lavar con agua corriente y contrastar con azul de metileno
por 30 segundos.
Lavar con agua corriente, secar y observar al microscopio.

RESULTADO :

Las bacterias ácido resistentes se tiñen de rojo, las demás bacterias se tiñen de azul.

TINCION DE ESTRUCTURAS :

Para los estudios bacteriológicos hay varios métodos de tinción además de la técnica de Gram o alguna de sus modificaciones. Para determinaciones especiales pueden ser útiles el método para teñir esporas, cápsulas y flagelos. Es importante recordar que los organismos con características de tinción - deberán incluirse como controles de tinción en todos los casos.

TINCIÓN DE ESPORAS

La formación de esporas es un fenómeno poco común, ya que solamente dos géneros bacterianos de interés veterinario son capaces de formarlas: Clostridium y Bacillus, y de las últimas en particular, sólo B. Anthracis es indudablemente patógeno; la importancia de las bacterias formadoras de esporas, por ejemplo, Cl. tetani, se deriva de su asociación en la contaminación de heridas; entre otros Clostridios patógenos se encuentra los causantes del botulismo, "la pierna negra" y la gangrena gaseosa.

Las esporas se observan de la manera más simple como cuerpos refringentes intracelulares, o bien, liberada de la sustancia vegetativa de la célula, a diferencia de la célula vegetativa que la produce, la espora es muy resistente y puede sobrevivir largos períodos de tiempo, incluso en medios desfavorables por altas temperaturas, sustancias químicas o materia orgánica en descomposición.

La espora se tiñe fácilmente, pero una vez teñida resiste fuertemente la decoloración y el contraste, la tinción de esporas, se realiza utilizando los siguientes métodos:

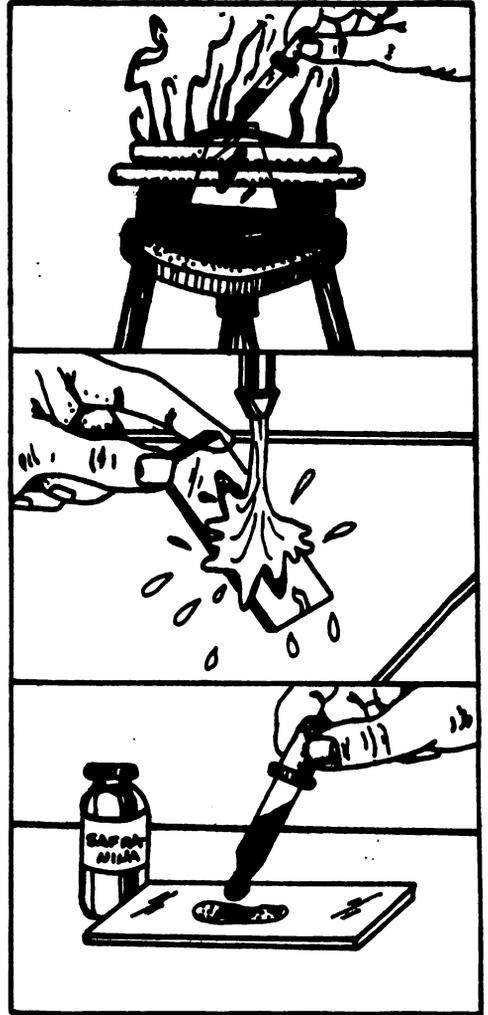
a.1 Método de Schaefer y Fulton (1953)

1. SOLUCIONES

- Verde de malaquita (al 5%) en agua destilada (si se está recién preparada), dejarla reposar por treinta minutos y filtrar).
- Safranina (al 0.5%) en agua destilada

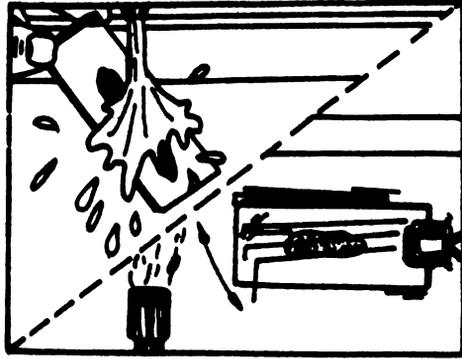
2. PROCEDIMIENTO

- Cubrir la extensión (fijada con calor) con verde de malaquita y calentar hasta la formación de vapor durante 1 minuto.
- Lavar perfectamente con agua corriente.
- Contrastar, aplicando safrani-
na en solución acuosa durante
15 a 30 segundos.
- Lavar, escurrir y secar cerca
del mechero.

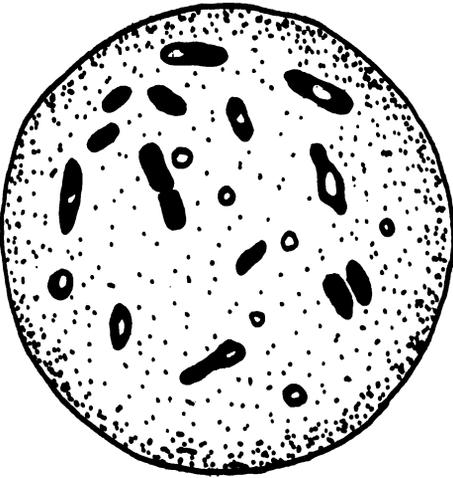


PROCEDIMIENTO :

Lavar, escurrir y secar -
cerca del mechero.



Las esporas se tiñen de verde, el cuerpo de la bacteria se -
tiñe de color rojo. La espora puede estar localizada en el -
centro del cuerpo celular, en cuyo caso se denomina central,
puede estar entre en centro y un extremo de la célula, en el
caso de ser subterminal o bien puede ser terminal si aparece
en alguno de sus extremos.



Tipos de esporas bacterianas;
terminal, subterminal, central,
esféricas y oval.

El método para la demostración de esporas puede emplearse como tinción en frío, dejando actuar al verde de malaquita durante 10 minutos.

METODO DE COLORACION PARA ESPORAS EN FRIJO

Soluciones :

Verde de malaquita (al 7%) en agua destilada
Safranina en solución acuosa al 0.25%

PROCEDIMIENTO

Preparar un frotis fijo para tinción
Teñir durante 10 minutos con verde de malaquita sin aplicar calor.
Lavar durante 10 segundos utilizando agua corriente
Contrastar con safranina durante 15 segundos
Lavar y secar

RESULTADO

Las esporas se tiñen de verde el resto de la célula de rojo.

TINCION DE CAPSULAS

La cápsula bacteriana consiste en limo excretado, habitualmente un polisacárido aunque en un caso Bacillus anthracis consiste en un polipéptido del ácido glutámico, las células encapsuladas forman en los medios de cultivo, colonias lisas y mucoides mientras que las células no capsuladas producen colonias rugosas.

La única función conocida de la cápsula es la de proteger a la bacteria de la fagocitosis y de los virus que deben fijarse a la pared celular.

El grosor de la cápsula varía de especie a especie y aún dentro de la misma capa dependiendo de la fase de la curva de crecimiento en que se encuentre el cultivo. La sustancia capsular es antígenica, reacciona con anticuerpos específicos para producir una reacción de microprecipitación que al alterar su índice de refracción la hace más fácilmente observable, este fenómeno es conocido como reacción de Quellung y va acompañado en algunos casos por un aumento en el volumen de la cápsula.

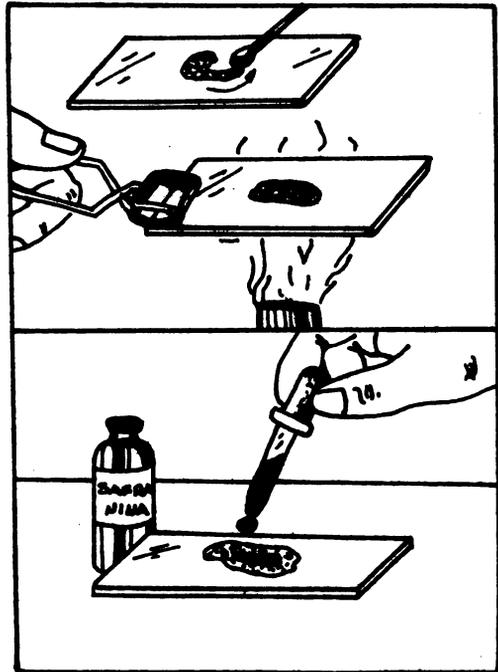
La tinción para cápsula puede ser diagnóstica como en el caso de infecciones por Cryptococcus neoformans en extensiones de líquido cefalorraquídeo.

Generalmente la cápsula se pone de manifiesto mediante una tinción negativa o una modificación de ella ya que por las técnicas usuales no pueden observarse al no retener los colorantes utilizados.

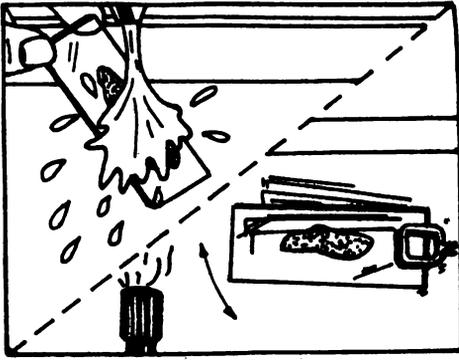
La tinta china o la tinta pelicano son útiles para realizar la técnica (el fondo está integrado por partículas, no es homogéneo y por esta razón muchos laboratoristas prefieren usar solución de nigrosina al 10%).

PROCEDIMIENTOS

Preparar una extensión delgada con la muestra y fijar la mediante calor.



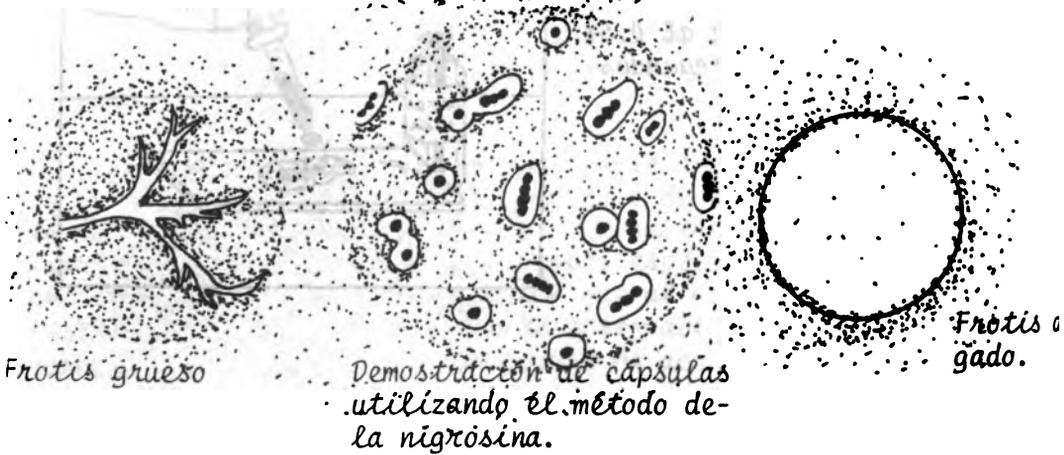
Teñir con safranina al 0.5% por espacio de 30 segundos.



Lavar con agua corriente y escurrir, secar cerca del mechero.



Se esparce la nigrosina sobre la laminilla utilizando la técnica para frotis sanguíneo.



Frotis grueso

D demostración de cápsulas utilizando el método de la nigrosina.

Frotis gado.

METODO DE MUIR PARA CAPSULA

1. Soluciones :

- Acido tánico 2 volúmenes
- Solución saturada de cloruro de mercurio 2 volúmenes
- Solución acuosa saturada de sulfato aluminicopotásico. 2 volúmenes

2. Procedimiento :

- Preparar una extensión delgada y uniforme del cultivo, fijarla mediante calor y cubrir la película con papel filtro.
- Teñir con fuscina fénicada durante 60 segundos y calentar hasta la formación de vapor.
- Lavar con alcohol, luego con agua corriente
- Aplíquese mordiente durante 30 segundos
- Lavar con agua corriente
- Contrastar con Azul de metileno durante 30 segundos.

3. Resultados :

Las células se tiñen de rojo y las cápsulas de azul.

TINCION DE FLAGELOS :

Los flagelos son estructuras demasiado finas (12 a 30 nm de diámetro) para ser visibles en el microscopio óptico, sin embargo, si se tratan con suspensiones coloidales inestables de sales de ácido tánico puede ponerse de manifiesto su presencia y disposición en las células por medio de la formación de un precipitado grueso que se deposita sobre la pared celular y de los flagelos; en esta forma el diámetro aparente de estas estructuras aumenta de tal modo que una tinción subsecuente con fuscina básica las hace visibles en el microscopio.

En las bacterias peritricas los flagelos se agrupan en forma de heces durante el movimiento y éstos pueden ser suficientemente gruesos como para ser observados, estudiando las células vivas mediante microscopía de campo oscuro de contraste de fase, la tinción de flagelos puede realizarse utilizando el método de Leifson (1960).

METODO DE LEIFSON PARA LA COLORACION DE FLAGELOS

1. Soluciones :

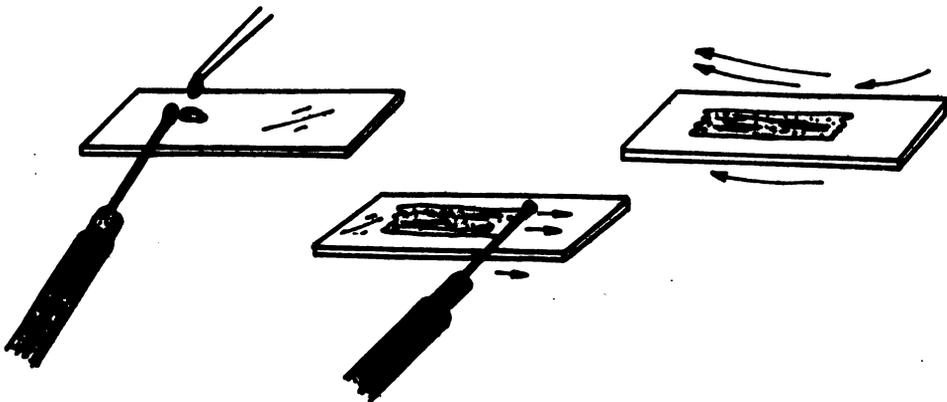
- Solución saturada acuosa	20 ml.
- Acido tánico (sol. acuosa al 20%)	10 ml.
- Agua destilada	40 ml.
- Alcohol etílico al 95%	15 ml.
- Fuscina básica (sol. saturada en alcohol al 95%).	3 ml.

La tinción de flagelos no debe de tomarse a la ligera, pero resultados razonablemente satisfactorios pueden obtenerse cuando se tiene cuidado en la preparación del cultivo, del frotis y de los reactivos.

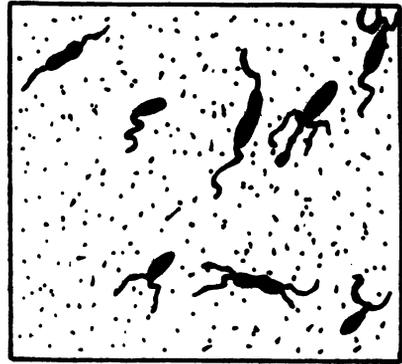
PROCEDIMIENTO :

- Preparar las laminillas limpiándolas en una solución de dicromato o ácido nítrico caliente perfectamente, lavar en agua, enjaguar en alcohol y secar.
- Preparar un frotis colocando una asada de bacterias cultivadas en medio líquido cerca de un extremo de la laminilla seca la cual inmediatamente se inclina a una posición vertical, de tal manera que la gota se deslice - dejando una película delgada con los bordes paralelos, - la extensión puede realizarse utilizando el asa de inoculación como se muestra en la figura .

Preparación de frotis delgado para tinción de flagelos.



Demostración de flagelos utilizando el método de Leifson.



Una vez que la laminilla se ha secado a temperatura ambiente, se inunda con la solución dejando reposar durante 10 minutos.

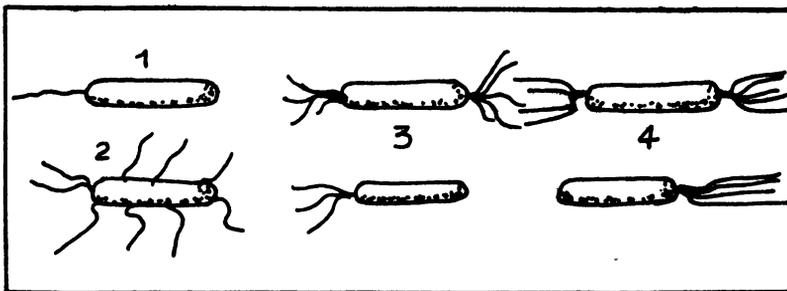
Lavar perfectamente con agua corriente

Secar y examinar.

RESULTADOS :

Los flagelos se tiñen bien de color rojo, en aquellas bacterias que no presentan flagelos extremadamente delicados.

Los flagelos pueden presentar diferente posición, dependiendo - el género bacteriano.



Situación de los flagelos: 1) Monotrichos; 2) peritrichos; 3) multitrichos; 4) lofotrichos.

TINCION DE ESPIROQUETAS

(Método de Fontana, 1912)

1. SOLUCION :

Nitrato de Plata Amoniacaal :

Disolver 5 g. de Ag. en 100 ml. de agua destilada, retirar unos mililitros y añadir al resto una solución concentrada de amoníaco, gota a gota, hasta que el precipitado que se forma se disuelva; añadir luego gota a gota suficiente cantidad de nitrato de plata hasta que el reactivo permanezca ligeramente turbio aún después de agitar la solución se conserva en buenas condiciones durante meses.

2. PROCEDIMIENTO :

Preparar la extensión y fijarla por calor

Verter encima una solución de ácido tánico al 5% en fenol al 1% y permitir que se evapore durante 30 segundos.

Lavar durante 30 segundos con agua corriente

Cubrir con una gota del nitrato de plata amoniacal antes citado, calentar cuidadosamente encima de una llama y dejar reposar durante 20 a 30 segundos después de comenzar la evaporación.

Lavar perfectamente con agua

Ecurrir o secar con papel secante y examinar

3. RESULTADOS :

Las espiroquetas se tiñen de marrón o de negro en un campo marrón oscuro.

A menos que se haga una preparación, la extensión se desintegra después de una semana.

AISLAMIENTO :

La etapa de aislamiento consiste en el transporte y cambio de los microorganismos del medio natural donde se encuentran a un medio artificial (medios de cultivo y animales de experimentación) para su propagación en cultivo puro.

VENTAJAS :

Prerrequisito indispensable para la identificación de los agentes microbianos, salvo algunas excepciones.

Requerido para una determinación correcta de la sensibilidad a los agentes antibióticos y sulfas.

Desventajas :

Requiere de tiempo, equipo, conocimientos y experiencia
Puede ser peligroso para el personal de laboratorio
En algunas ocasiones se puede llegar al diagnóstico con técnicas menos laboriosas como: examen clínico, patológico, demostración, etc.

Métodos :

Obtener una muestra del material biológico en condiciones estériles y sembrar en estría, con objeto de aislar los microorganismos en cultivo puro (ver técnicas de sembrado para obtención de cultivos puros).

Si se sospecha de contaminación de la muestra, se recomiendan los siguientes procedimientos para reducir al máximo la posible contaminación: esterilización de la superficie de los órganos con una espátula caliente, centrifugación diferencial, filtración o bien, siembra en medios selectivos.

MEDIOS DE CULTIVO :

Prácticamente todos los microorganismos, pero en particular las bacterias y los hongos, pueden cultivarse sobre substratos nutritivos para el estudio de sus propiedades o para la utilización de ciertas propiedades en condiciones controladas.

Ya que los diversos microorganismos exigen requisitos diversos al medio de cultivo, se necesitan en el laboratorio microbiológico una serie completa de medios de cultivos especiales.

La proliferación de bacterias es el resultado de una interacción compleja de diferentes sustancias alimenticias y principios activos en la cual intervienen factores físicos como la temperatura, el ph, el factor redox, etc.

Para su crecimiento todos los microorganismos requieren agua, además deben estar presentes en forma utilizable el carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno, calcio, fósforo y hierro, muchos microorganismos dependen además de oligoelementos como el manganeso, molibdato, zinc, etc.

Los microorganismos exigentes tienen necesidad además de factores de crecimiento como los aminoácidos, vitaminas, purinas u otras sustancias que no pueden utilizar ellos mismos.

El carbonato se necesita en la mayor parte de las veces de compuestos orgánicos que luego sirven como fuente de energía, el oxígeno, se toma principalmente de la atmósfera las necesidades de hidrógeno se cubren con compuestos orgánicos y en casos particulares también a partir de compuestos inorgánicos. El nitrógeno proviene de sales en forma de nitratos, nítricos o compuestos amoniacales, o de componentes más complejos como aminoácidos, peptonas o proteínas. Los otros elementos se toman principalmente de sales.

Los medios de cultivo sintéticos están compuestos de una serie de sustancias químicas definidas exactamente, los medios de cultivo complejos contienen diferentes extractos, hidrolizados u otros aditivos.

Para la producción de medios de cultivo se añade un agente de solidificación a las soluciones nutritivas líquidas. El agar-agar es un agente de solidificación prácticamente ideal, funde a temperaturas superiores a 90°C pero al enfriar permanece líquido hasta una temperatura de aproximadamente 040°C.

El agar-agar es un extracto seco, gelificante obtenido de algunas especies marinas de algas rojas, particularmente de los géneros *Gelidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia* y *Adanthopeltis*.

En el medio de cultivo pueden estar presentes colorantes e indicadores, cuyo cambio de color será característico para un determinado intervalo de ph,.

Los colorantes e indicadores son de importancia capital en la preparación de la mayor parte de los medios de cultivo diferenciales en tales medios los colorantes pueden actuar de la siguiente manera:

a) Como Agentes bacteriostáticos o como agentes inhibidores que impiden o detienen el desarrollo de un determinado grupo de microorganismos comensales que restringen, o impiden el crecimiento del germen o gérmenes que nos interesa aislar. b) Como indicadores de los cambios de acidez o de alcalinidad que experimenta el medio de cultivo (substrato). c) Como indicadores redox en ciertos medios de cultivo especiales, el azul de metileno y la resarzurina son los indicadores redox más utilizados por su color indican la presencia o ausencia de oxígeno en algunos de los medios utilizados en bacteriología anaerobia.

INDICADORES DEL PH Y SUS CARACTERÍSTICAS

INDICADORES	USUAL	CAMBIO DE COLOR	
		ACIDO	ALCALINO
Rojo de metilo	0.2	4.2 rojo	6.3 amarillo
Rojo de clorofenol	0.2	4.8 amarillo	6.4 púrpura
Andrade	-	5.0 rosa	8.0 amarillo
Púrpura de bromo- creosol.	0.2	5.2 amarillo	6.8 púrpura
Azul de bromotinol	0.2	6.0 amarillo	7.7 azul
Rojo neutro	0.1	6.8 rojo	8.0 amarillo
Rojo de fenol	0.2	6.8 amarillo	8.4 rojo
Rojo de cresol	0.2	7.2 amarillo	8.8 rojo
Azul de tinol	0.2	8.0 amarillo	9.6 azul
Fenolftaleína	0.1	8.3 incoloro	10.0 rojo
Azul de china	-	4.8 azul	6.8 incoloro
Azul de tinol (ácido)	-	1.2 rojo	2.8 amarillo
Naranja de metino		3.1 rojo	4.4 amarillo
Azul de bromofenol		3.1 amarillo	4.7 azul
Rojo de congo		3.0 azul	5.2 rojo
Verde de bromocresol		3.1 amarillo	4.7 azul
Resarzurina		3.8 naranja	6.5 violeta
Tornasol		4.5 rojo	8.3 azul

CLASIFICACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO :

Como es lógico suponer no todos los medios de cultivo son utilizados para el aislamiento de todas las cepas bacterianas, no sólo no son aptos para el aislamiento de microorganismos en general sino que además poseen la capacidad de inhibir a algunos y favorecer el desarrollo de otros.

Basados en el propósito para el cual son fabricados los medios de cultivo, se pueden clasificar de la siguiente manera:

a) Medios de cultivo básicos :

Son medios simples que contienen en general los nutrientes esenciales para promover el desarrollo de microorganismos poco exigentes nutricionalmente, reciben también el nombre de medios generales y pueden ser utilizados en análisis cuantitativos, para muestreos de medio ambiente y superficies y para conservar cepas con este tipo de medio. Ejemplo: caldo nutritivo, agar nutritivo, caldo tioglicolado, caldo triptosa y agar tripticosa soya entre otros.

b) Medios enriquecidos :

Son medios que han sido suplementados con otros nutrientes que proporcionan factores de crecimiento y cuya finalidad es promover el desarrollo de microorganismos más exigentes. Ejemplos: agar sangre, agar chocolate, agar puro, agar glicerol, y en general todos aquellos medios adicionados con plasma, líquido ascítico, vitaminas y aminoácidos.

c) Medios de enriquecimiento :

Son muy utilizados; sobre todo en los cultivos entéricos, estos medios están concebidos para aumentar la propagación de ciertos organismos sin favorecer a otros. Estos medios son muy eficaces en el aislamiento de Salmonella a partir de heces. Ejemplo: caldo selenito de sodio, caldo selenito y cistina, caldo tetratiónato, caldo-sal-colistina, agar sangre, levadura de cerveza, agar yema de huevo, leche, etc.

d) Medios selectivos :

Son muy utilizados cuando se trabaja con muestras que provienen de áreas del cuerpo que poseen una flora normal abundante (faringe, boca, piel, nariz, vagina). En estos se incorporan sustancias inhibidoras de la propagación de un grupo de bacterias pero permiten en cambio el crecimiento de otros grupos. Así para el cultivo entérico, los medios usados de modo habitual contiene ciertos colorantes e ingredientes que inhiben los organismos Gram positivos y permiten la propagación de los bacilos entéricos Gram negativos; si por el contrario, se desean aislar Enterococos o Staphilococcus en los estudios de intestino, pueden incorporarse por ejemplo, ácido sódico al agar sangre, lo cual inhibe los bacilos Gram negativos.

COMPUESTOS INHIBIDORES USADOS EN MEDIOS SELECTIVOS :

COMPUESTO	DILUCION EN EL MEDIO	PARA AYUDAR AL AISLAMIENTO
Cristal violeta	1: 700.000	<u>Brucella</u>
Acetato de talio	1: 8.000	<u>PPLD y Streptococcus</u>
Azida sódica	1: 2.000	<u>Streptococcus</u>
Azida sódica	1: 1.000	<u>Erysipelothrix</u>
Verde brillante	1: 40.000	<u>Campylobacter fetus</u>
Verde brillante	1: 80.000	<u>Salmonella</u>
Telurito potásico	1: 10.000	<u>Listeria, Corynebacterium</u>
Hidrato de coral	1: 1.000	<u>Todos los patógenos</u>
Estreptomocina y <u>Ka</u> ' namicina.	100 mg/ml.	Anaeróbios
Fluorouracil	0.002%	<u>Leptospira</u>

Debe recordarse que también se logra un efecto selectivo hacia cierto grupo de microorganismos simplemente variando la temperatura, el ph, atmósfera o adicionando algunos antibióticos como en el caso del medio de tripticasa soya agar + penicilina-¹ o bacitracina, utilizando en el aislamiento del género Brucella

Otros ejemplos serían: el medio de Lowenstein-Jensen-utilizando en el aislamiento de Micobacterias el medio de Fletcher, útil- para el aislamiento de Leptospira y el medio de agar sal y manitol utilizado en el aislamiento Staphylococcus .

Este tipo de medios debido a los componentes químicos e indicadores que contienen, permiten identificar con cierta facilidad algunos géneros o especies bacterianas por el aspecto característico que toman sus colonias .

ASPECTO DE LAS COLONIAS BACTERIANAS EN BASE A LA FERMENTACION DE LA LACTOSA

MEDIO DE CULTIVO	LACTOSA (+)	LACTOSA (-)
Agar verde brillante	verde- amarillenta	rosa-roja
Agar Mac conkey	rosa- morada	incoloras
Salmonella-Shigella	rojas- rosas	incoloras
Agar ENDO	rojas	gris
Eosina azul de metileno	café oscuro	incoloras
Agar de mentol y manitol	halo amarillo (S.aureus)	halo rosa (S.epidermidis)
Agar de chapman-Stone	amarillas	blancas

MEDIOS PARA EL ESTUDIO DE CARBOHIDRATOS

En los medios de cultivo, los carbohidratos son muy utilizados como fuente de energía por las bacterias, y prácticamente para diferenciar géneros e identificar especies; se utiliza generalmente el agua peptonada como base para el estudio de los azúcares, las soluciones de carbohidratos empleados - para estas pruebas deben esterilizarse ya que al calentarse (y sobre todo el sobrecalentamiento) los azúcares sufren varios fenómenos, como la hidrólisis de los azúcares complejos la formación de productos de oxidación y reaccionar con algunos otros componentes de los medios de cultivo como aminoácidos.

La descomposición por calor de un carbohidrato se manifiesta porque baja el pH o visiblemente por el oscurecimiento (caramelización de la solución). Ejemplo: medio basal OF de Hugh y Leifson, medio para MR-VP y todos aquellos en los cuales se pruebe algún azúcar en particular (agua peptonada + glucosa, matinol, sucrosa, sorbitol, galactosa, etc.)

Medios de Transporte .-

Son medios utilizados en el envío de muestras al laboratorio, algunos contienen sustancias reductoras o nutrientes que permiten a los microorganismos conservarse viables hasta llegar al laboratorio. Ejemplo: medio de transporte de Stuart, caldo tioglicolado, caldo nutritivo y medio de Carry.

PREPARACION Y DISTRIBUCION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los fundamentos de preparación distribución y esterilización de los medios de cultivo son esencialmente iguales, utilizando las formas deshidratadas o bien añadiendo los distintos ingredientes por separado.

Casi todos los medios de cultivo utilizables se encuentran en el comercio en forma deshidratada, y se presentan en forma de polvo de granulados; la forma granulada de los medios deshidratados representa un producto mejor, respecto a la forma en polvo, la granulación asegura una distribución más uniforme de

las diferentes sustancias en particular de las sustancias activas presentes en cantidades pequeñas, otra ventaja reside en la homogenización más rápida y por consiguiente la disolución de los granulados en forma completa.

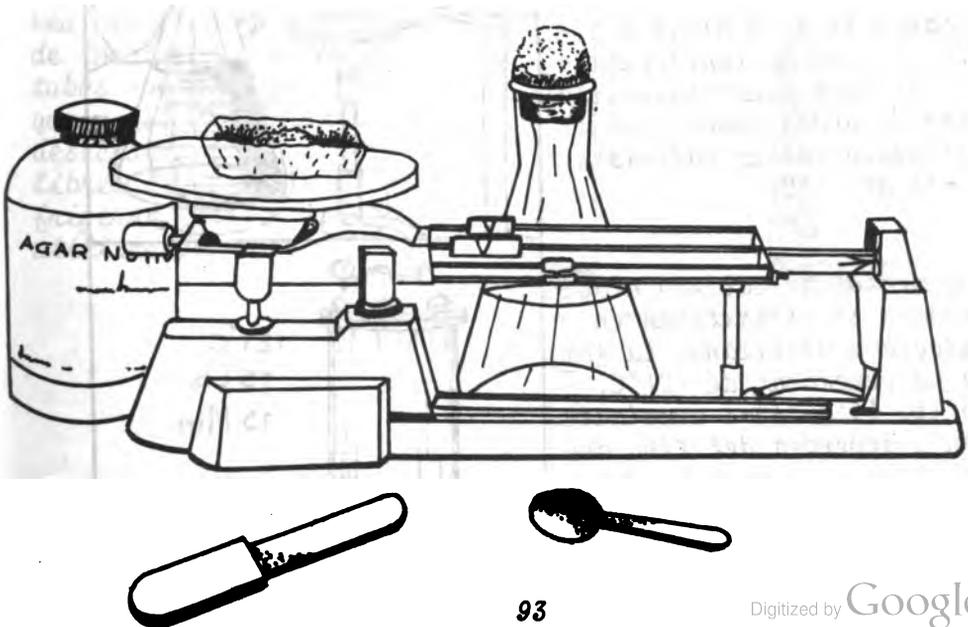
En la etiqueta de todos los frascos constan las instrucciones para reconstituir los medios deshidratados y se determinan simplemente la cantidad necesaria de polvo y se añade agua destilada; es importante utilizar un frasco o matraz Erlenmeyer lo suficientemente grande para que se pueda remover o agitar bien para disolver el medio. Si se quiere hacer un litro de medio, por ejemplo, es conveniente emplear un frasco de dos litros, si el medio no contiene agar, tal vez se disuelva sin calentar, pero todos los que contienen agar requieren calor para subir la temperatura a 100°C. aproximadamente, este calentamiento no debe hacerse nunca con una llama directa, porque existe el peligro de quemar el medio o romper el matraz; colóquese el matraz en baño maría y muévase o agítese a intervalos frecuentes hasta que el agar haya fundido; si se ven copos de agar, es evidente que éste no se ha fundido y que hay que continuar calentando.

Estos medios se distribuyen en recipientes adecuados mientras están todavía calientes, los métodos de distribución de los medios disueltos en cajas de Petri, tubos o frascos, dependen del tipo del medio y de la finalidad de su empleo.

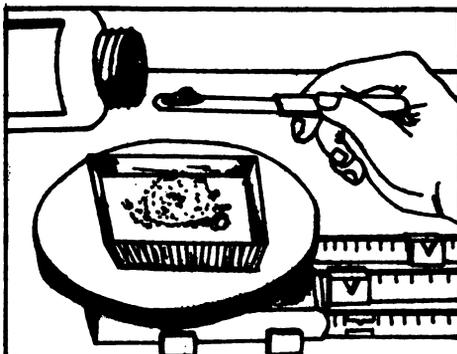
PREPARACION Y DISTRIBUCION DEL AGAR EN CAJA DE PETRI

Para preparar las cajas de Petri, hay que esterilizar primero el medio en un matraz y a continuación verterlo en las cajas + estériles hasta una altura de 3 mm. antes de verter el agar - fundido en las cajas de Petri hay que dejarlo enfriar a unos 50-55°C. para prevenir la condensación de humedad en las paredes del recipiente

Material necesario para la reconstrucción de los medios de cultivo.



Pesar la cantidad requerida del medio deshidratado utilizando una canastilla de plástico o aluminio, evitando con este pérdidas del polvo sobre la báscula.



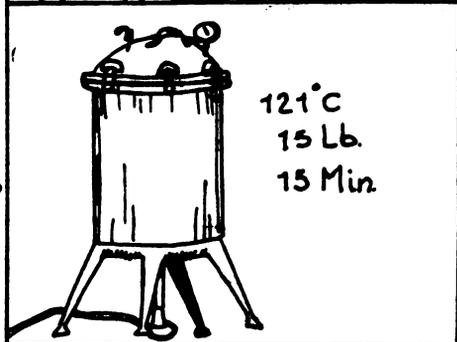
El medio se añade a una pequeña cantidad de agua destilada o desmineralizada fría, y se distribuye uniformemente por agitación, seguidamente se añade la cantidad restante de agua y se homogeniza.



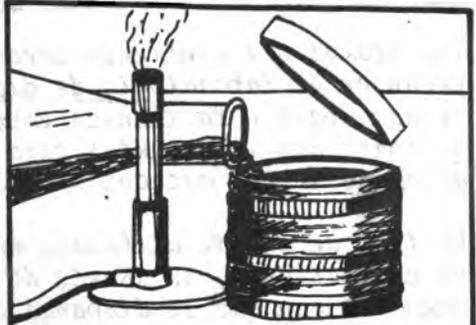
Se deja reposar la solución durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente, para que el agar pueda hincharse para disolver completamente los medios deben calentarse a más de 95°C.



Los medios de cultivo clasificados se esterilizan en autoclave utilizando la forma convencional de 121°C. 15 lb. 15', estas constantes van a depender del tipo del medio a esterilizar.



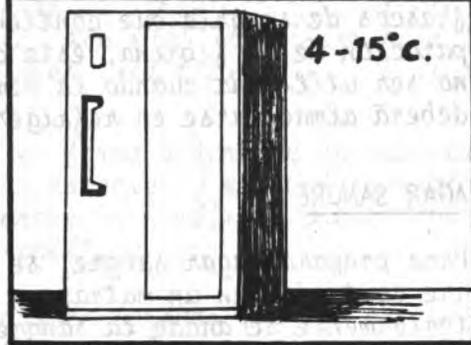
El medio agarificado, todavía líquido se vierte en las cajas de Perti. El volumen es variable y depende del tamaño de las cajas; se recomiendan 15 a 20 ml. para las cajas de 3 1/2 plg. y de 20 a 35 ml. para las cajas de 4 plg.



Si aparecen burbujas de aire en las cajas, se eliminan pasando la llama del mechero de Bunsen por la superficie. Las cajas se pasan por una prueba de esterilidad que consiste en incubarlas por 24 horas a 37°C.



Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las cajas y los tubos son revisadas. Aquellas que muestren contaminación, se desechan; por el contrario, las libres de contaminación se refrigeran entre 4-15°C hasta su utilización.



PREPARACION DE AGAR SANGRE Y AGAR CHOCOLATE

Los medios que contienen sangre total son los que más se emplean en el laboratorio de diagnóstico. El tipo de sangre, el agar base y la técnica empleada para la preparación son factores muy importantes para que se consiga un aislamiento adecuado de los microorganismos.

El tipo de sangre utilizada en la elaboración de estos medios es en ocasiones, un asunto de conveniencia y depende de los animales con que se disponga en el laboratorio, cuando se adquiere de una fuente comercial, por lo general se utiliza sangre de caballo, pero puede ser empleada la sangre de otras especies (hombre, cabra, bovino, conejo, oveja).

El conservador utilizado durante la obtención de sangre varía dependiendo el propósito de su utilización en el medio de cultivo, se ha mencionado por ejemplo; que el citrato de sodio es inhibitorio para los estafilococos (Rammell 1962) y el Li-
quid para los cocos anaerobios .

En la mayoría de los laboratorios se prefiere la sangre defibrinada, la cual se toma en condiciones de esterilidad en frascos de sangría que contienen perlas de vidrio para la separación de la fibrina, ésta debe ser relativamente fresca y no ser utilizada cuando la hemólisis es evidente, la sangre deberá almacenarse en refrigeración y no ser congelada.

AGAR SANGRE .-

Para preparar agar sangre, se esteriliza la base del agar sangre contenida en un matraz, y luego se enfría a 50-55°C. posteriormente se añade la sangre al agar derretido en una cantidad de 5-10% y se mezcla concienzudamente haciendo rotar el frasco; una vez hecha la mezcla se vierte en cajas de Petri previamente esterilizadas hasta una profundidad de 3-6 mm.

Esta profundidad tiene considerable importancia puesto que con frecuencia interesa comprobar la presencia o ausencia de hemólisis, si la copa de agar es demasiado gruesa puede pa --

Producción de B- hemólisis en medio de agar sangre.



sarse por alto la hemólisis. Brown (1919) estudió las zonas hemolíticas alrededor de las colonias de Streptococcus el placas de agar sangre y dió nombres a los tipos de hemólisis: Alfa (α) zona verde, las envolturas celulares intactas; Beta (β) ninguna acción sobre los glóbulos rojos.

Los Staphylococcus se comportan en forma diferente en las placas preparadas con sangre de diversas especies y es confuso hablar de Staphylococcus hemolíticos porque la hemólisis puede deberse a una hemolisina o una enzima lipolítica.

Algunas cepas de Clostridium producen toxinas que son capaces de provocar hemólisis en el agar sangre, esta característica puede ser de gran ayuda para identificar las diferentes cepas de este microorganismo. Algunos técnicos prefieren colocar una capa de agar bacteriológico en el fondo de la capa fina de agar sangre - al 10% para facilitar la apreciación de hemólisis.

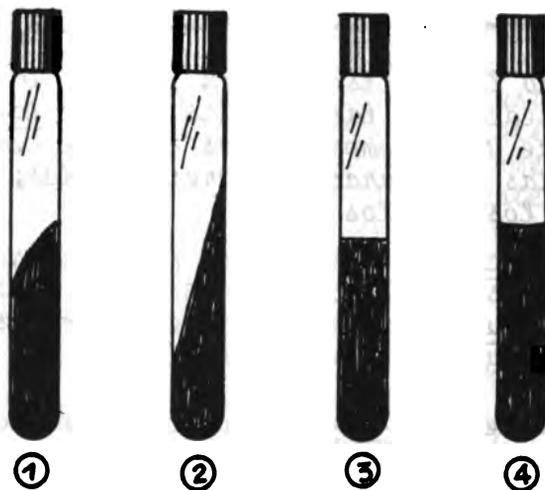
DISTRIBUCION DEL MEDIO DE CULTIVO EN TUBOS

Los medios líquidos (por ejemplo, el caldo de infusión cerebro corazón) pueden servirse en los tubos con una pipeta automática o calibrada para soltar la cantidad de medio deseado, no es necesario emplear tubos esterilizados para este fin.

Para las preparaciones en tubo en plano inclinado (sólido) u horizontal, (sólido o semisólido) el medio preparado se distribuye en los tubos de ensayo y se coloca en el autoclave en posición vertical.

Una vez esterilizado el medio se deja enfriar en posición inclinada en el extremo de la mesa, la cantidad de medio por tubo depende de la longitud e inclinación deseadas.

PRESENTACIONES DEL MEDIO DE CULTIVO EN TUBO:



1 y 2: agar sólido inclinado

3 agar semisólido

4 medio líquido

TECNICAS DE SEMBRADO EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

La mayoría de las bacterias pueden multiplicarse formando colonias visibles en medios de cultivo artificiales, originalmente la preparación de estos medios era laborioso y sin estandarización de sus componentes, pero en la actualidad se cuentan con preparados comerciales que facilitan la elaboración de los medios y garantizan la estandarización de los ingredientes incluidos en ellos.

Los medios de cultivo una vez preparados y listos para ser inoculados con bacterias, pueden tener varias presentaciones en cuanto a su consistencia, la cual está determinada por la concentración de agar presente en el medio o la ausencia del mismo.

El agar es un polisacárido ácido que proporciona geles bien formados y consistentes a la concentración usual de 1.0 a 1.5 % y que no licúa a la temperatura estandar de incubación (37°C) presentando además, la ventaja de resistir la acción enzimática de las bacterias.

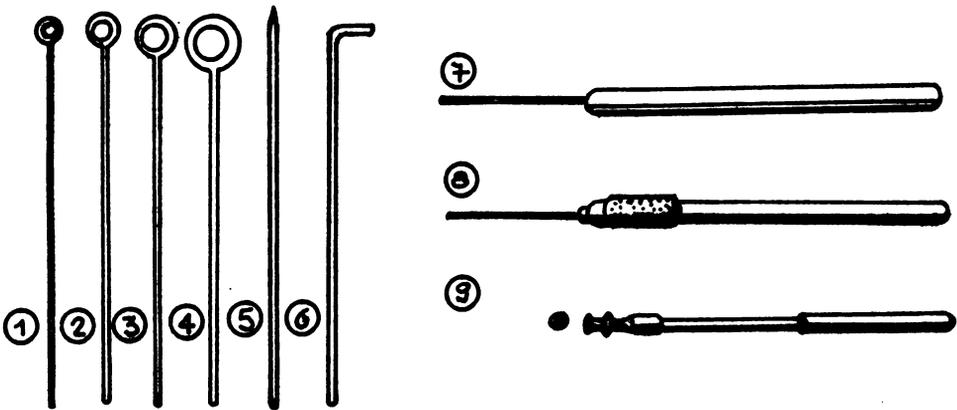
<u>TIPO DE MEDIO</u>	<u>JAPONES</u>	<u>NEO-ZELANDES</u>	<u>AMERICANO</u>
MEDIO SOLIDO	1.5-2.0	1.0-1.2	1.5
MEDIO DURO	7.0	4.0	-
SEMISOLIDO	0.1-0.5	0.05-0.3	0.3-0.4
MEDIO LIQUIDO (sin agar)		0.05-0.3	

El instrumento más utilizado del equipo de un laboratorio bacteriológico es el asa de inoculación; esta puede ser de alambre de platino, nicromo u otro material parecido el cual se inserta en un mango; también hay que disponer de un alambre recto para las inoculaciones por punción y para recoger las colonias aisladas de las cajas de Petri sembradas.

Existen en el mercado asas microbiológicas calibradas para tomar un volumen constante de inóculo.

Las asas calibradas más utilizadas con este fin son las de 0.1 ml. y 0.001 ml. estas son utilizadas ampliamente para el análisis bacteriológico cuantitativo de agua y orina sin diluir.

ASAS DE INOCULACION UTILIZADAS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA



1, 2, 3, 4; asas calibradas para Bacteriología
5, aguja de inoculación para medios semisólidos
6, asa en forma de L utilizada en Micología,
7, 8, 9; porta asas.

La inoculación de cada uno de los medios de cultivo, se realiza de manera diferente de acuerdo al fin que se persigue, el aislamiento de las bacterias de las muestras remitidas al laboratorio, se realiza casi siempre por sembrado en la superficie de una placa de agar en líneas paralelas por medio de un asa; este procedimiento asegura la suficiente dilución permitiendo el desarrollo de colonias aisladas que pueden emplearse para la obtención de "cultivos puros" en los que se pueda realizar la identificación.

A partir del inóculo se realizan una serie de estriás en un cuadrante de la superficie del medio y esterilizando el asa, se realiza otra estriá a partir de un extremo de la primera y así sucesivamente hasta completar cuatro series de estriás.

El flameado del asa entre cada estriá asegura la disminución del número de bacterias, lo cual permite el crecimiento aislado de las mismas.

La mayor parte de estas colonias aisladas serán "cultivos puros" de un organismo y pueden recogerse para la próxima fase, la identificación, también las características de la colonia y la morfología celular ayudarán a la identificación final, por lo tanto, es indispensable que se emplee una técnica adecuada para la siembra.

INOCULACION DE MEDIO SOLIDO EN CAJA DE PETRI

Las placas una vez inoculadas se incuban en posición invertida con los medios hacia arriba a 37°C y se examinan a intervalos de 24-48 horas. Se pueden apreciar las diversas colonias, las cuales deberán ser examinadas con mucho cuidado (tomando en cuenta su morfología, borde, tamaño y color), tratando de encontrar alguna característica que nos pueda señalar el uso de alguna técnica especial.

Después de que la placa ha sido incubada, y para la obtención de cultivos puros, cualquier colonia bien aislada es removida con un asa, pero tal vez sea más conveniente emplear un alambre recto para esto sobre todo si las colonias están muy juntas.

La colonia es resuspendida en un medio líquido o bien sembrada directamente en otra caja conteniendo algún medio específico - dependiendo el agente que se sospeche.

Para ciertos tipos de muestras, por ejemplo las de orina o de sangre, se coloca una cantidad determinada de la muestra en una placa de Petri estéril y se vierte encima el agar derretido (enfriado a 50°C) luego se hace rotar la placa para mezclar minuciosamente el material con el medio. Una vez que se ha solidificado a temperatura ambiente, se invierte la placa, se incuba a 37°C y se examinan las colonias, esta técnica ofrece la ventaja de dar una determinación cuantitativa de las bacterias. Si las muestras están muy contaminadas, es necesario realizar una dilución.

El resembrado de las colonias obtenidas en el aislamiento primario asegura la purificación de las diversas capas bacterianas y por lo tanto, la obtención de cultivos puros.

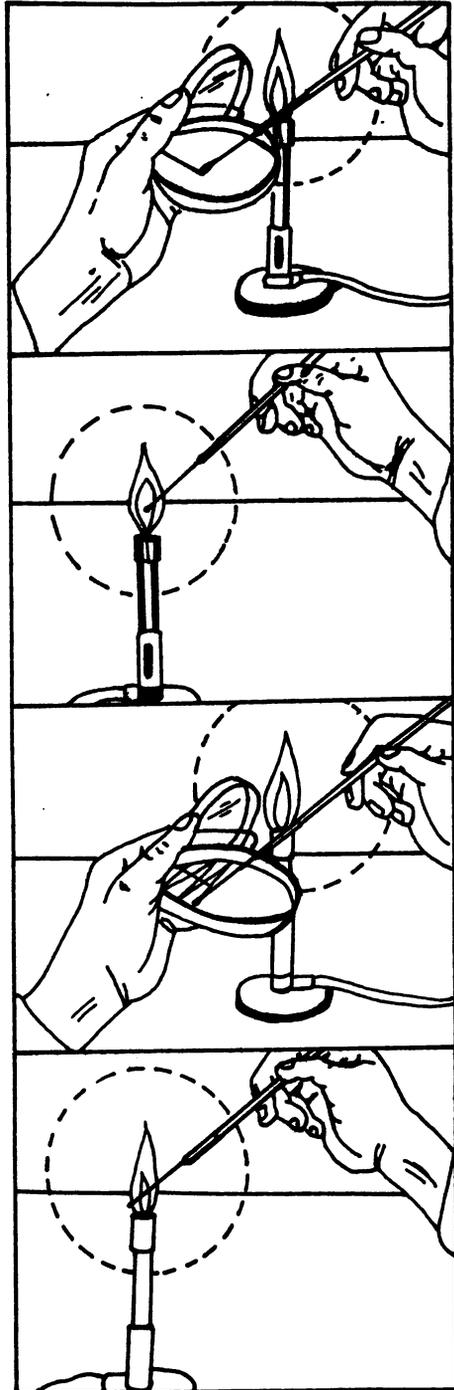
PROCEDIMIENTO:

Con un asa de inoculación esterilizada se colocan 2 tomas del material cerca del borde de la placa, y se realiza una estria inicial.

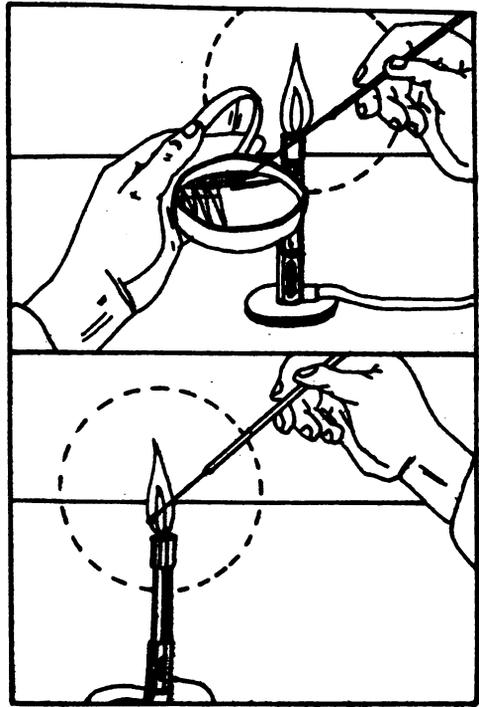
Se esteriliza el asa en la llama y se deja enfriar, se recomienda sumergirla en agua hirviendo antes de flamearla.

Después se emplea el asa para distribuir la muestra en la placa en estrias de la forma en que se indica en la figura, presionando ligeramente sin romper el agar.

Recordemos que el asa de inoculación deberá esterilizarse entre cada cambio de estria utilizando la flama de un mechero de Bunsen.

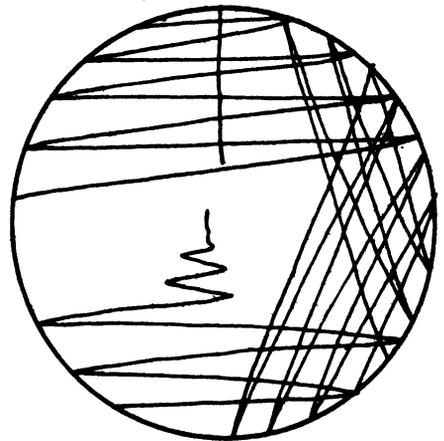


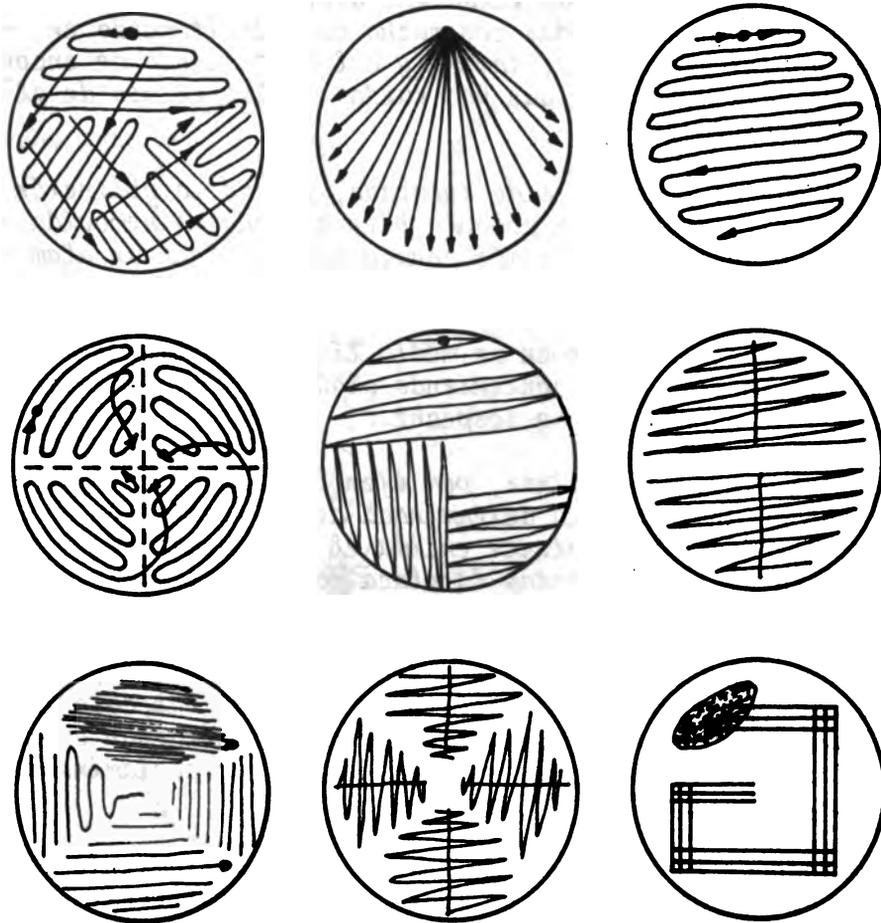
A partir del extremo de la -
primer estria, se realiza una
segunda y así sucesivamente -
hasta completar las cuatro es-
trias.



Al concluir el sembrado en la
placa, esterilizamos nuevamen-
te el asa, evitando con esto-
posibles contaminaciones a -
otros medios

Aspecto final de la placa sembrada
utilizando la técnica descrita an-
teriormente.





Diferentes técnicas de sembrado que pueden ser utilizados como patrones en la obtención de cultivos puros.

Las placas una vez inoculadas se incuban en posición invertida con los medios hacia arriba a 37°C y se examinan a intervalos de 24-48 horas. Se pueden apreciar las diversas colonias, las cuales deberán ser examinadas con mucho cuidado (tomando en cuenta su morfología, borde, tamaño y color) tratando de encontrar alguna característica que nos pueda señalar el uso de alguna técnica especial.

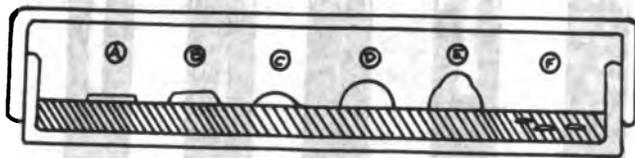
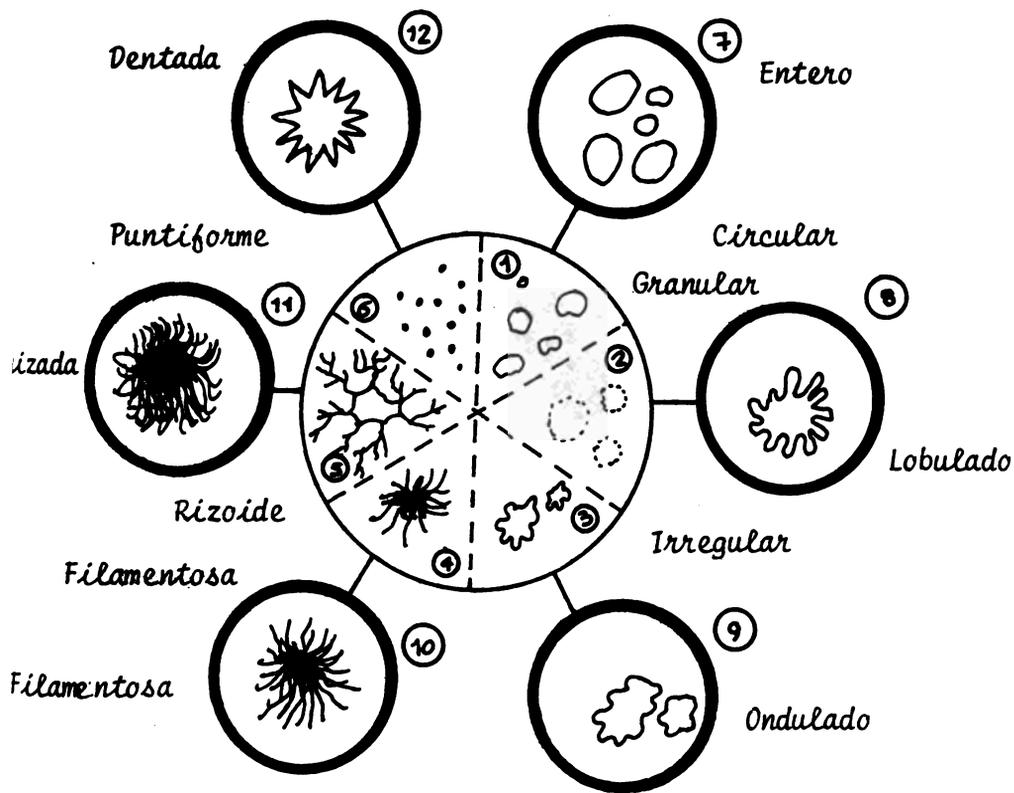
Después de que la placa ha sido incubada, y para la obtención de cultivos puros cualquier colonia bien aislada es removida - con un asa, pero tal vez sea más conveniente emplear un alambre recto para esto sobre todo si las colonias están muy juntas.

La colonia es resuspendida en un medio líquido, o bien sembrada directamente en otra caja conteniendo algún medio específico - dependiendo el agente que se sospeche.

Para ciertos tipos de muestras, por ejemplo, las de orina o sangre, se coloca una cantidad determinada de la muestra en una placa de Petri estéril y se vierte encima el agar derretido (enfriado a 50°C) luego se hace rotar la placa para mezclar minuciosamente el material con el medio.

Una vez que se haya solidificado a temperatura ambiente, se invierte la placa, se incuba a 37°C. y se examinan las colonias, - esta técnica ofrece la ventaja de dar una determinación cuantitativa de las bacterias. Si las muestras están muy contaminadas, - es necesario realizar una dilución.

El resembrado de las colonias ó tenidas en el aislamiento primario, asegura la purificación de las diversas cepas bacterianas - y por lo tanto, la obtención de "cultivos puros" .

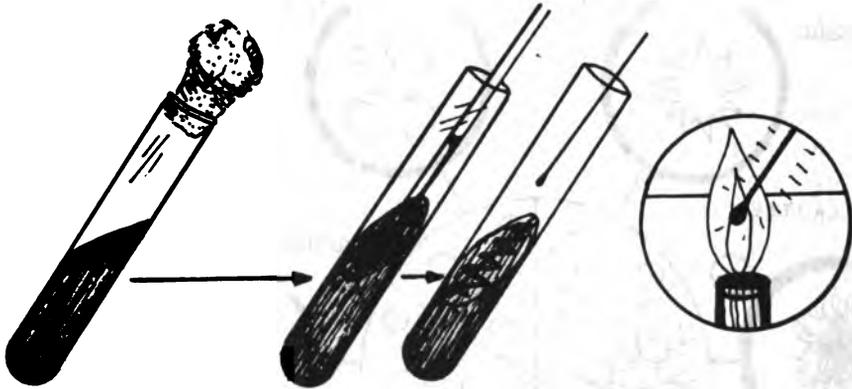


a) Plana, B) elevada, c) convexa, D) umbilicada, F) bajo la superficie.

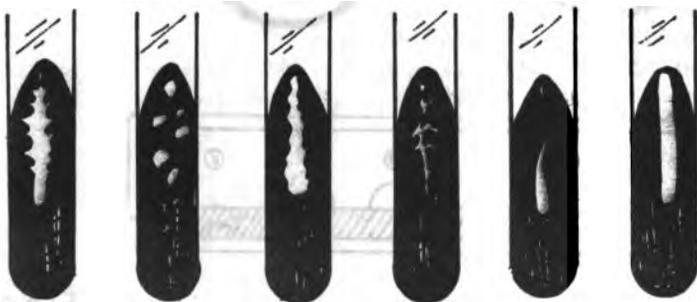
Aspecto macroscópico que presentan las colonias bacterianas en cuanto a su forma, borde y elevación.

INOCULACION DE TUBOS CON AGAR INCLINADO :

Sembrado en agar inclinado.



Los cultivos en una superficie de agar inclinado se realizan con frecuencia para mantener las copas puras, y para efectuar ciertos estudios bioquímicos. La inoculación se realiza a partir de una colonia aislada tomada de una placa. Con el asa se traslada el inóculo a la superficie del medio que se siembra enteramente por estriás a veces, es necesario practicar una incisión en la superficie del agar, por ejemplo; en el agar TSI para organismos estéricos la incisión nunca llega hasta el fondo.

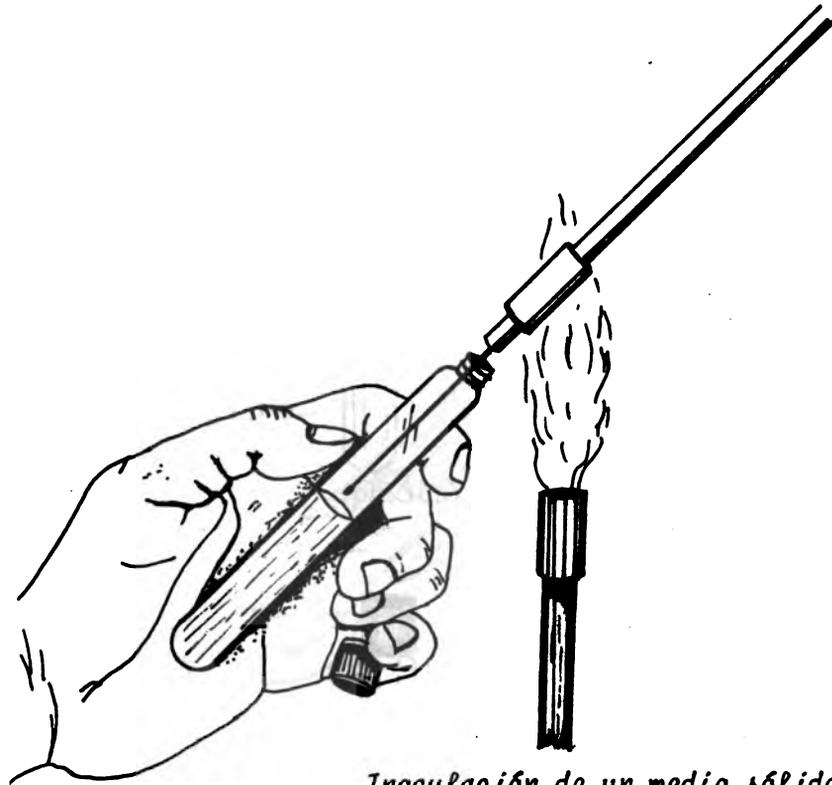


Diferentes tipos de crecimiento sobre agar inclinado.

INOCULACION DE TUBOS CON MEDIO SOLIDO HORIZONTAL

La inoculación de algún medio sólido presentado en tubo de ensayo con superficie horizontal, se realiza utilizando un alambre recto.

El método de sembrado consiste en quitar la tapa del tubo con el dedo meñique, flamear la boca del tubo e inocular por picadura evitando llegar hasta el fondo del medio.

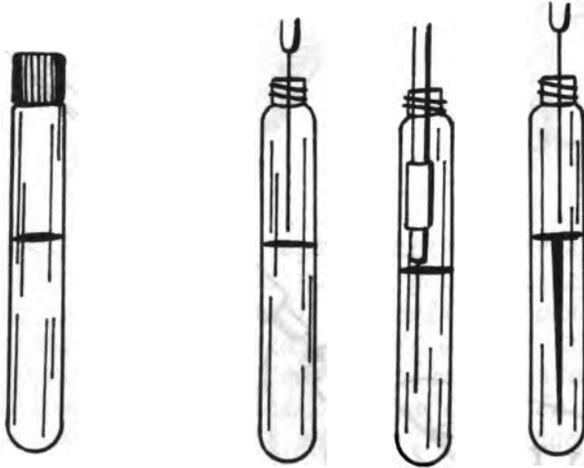


Inoculación de un medio sólido por picadura.

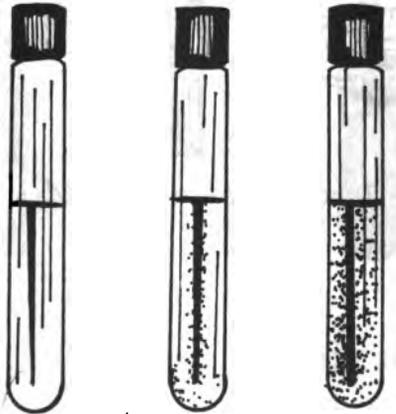
INOCULACION DE MEDIOS SEMISOLIDOS

Los medios semisólidos se emplean para los estudios de movilidad (Medio de SIM) carbohidratos (medio basal OF) o bioquímicos (gelatina).

Se inoculan utilizando un alambre recto, tratando de que la incisión no llegue al fondo del tubo.



Sembrado por picadura de un medio semisólido.



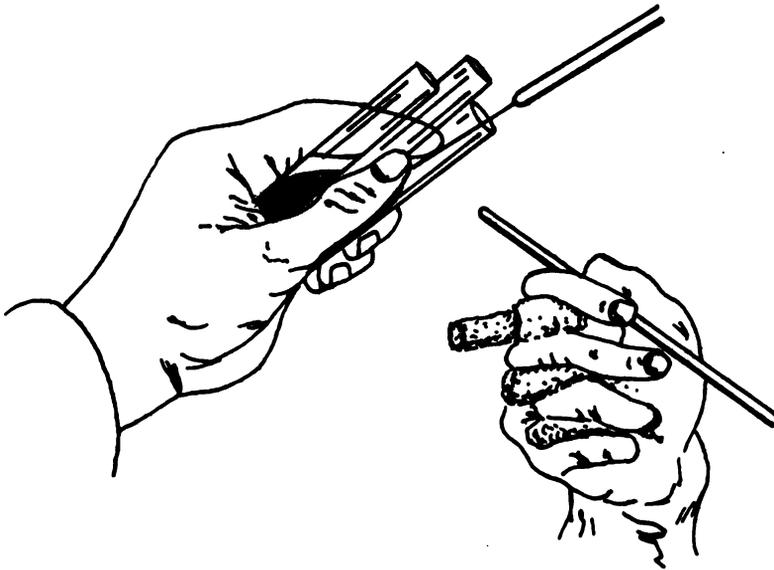
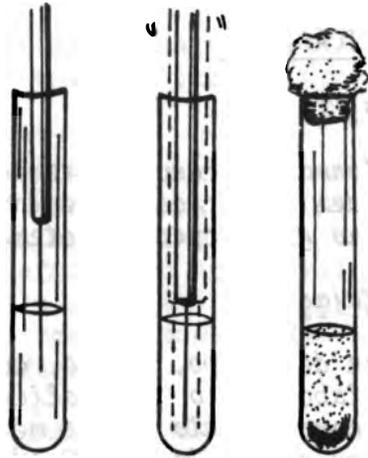
Crecimiento bacteriano en el medio SIM.

INOCULACION DE MEDIOS LIQUIDOS

La inoculación de los caldos de cultivo se efectúa con un asa o con un alambre recto a partir de la muestra u otros cultivos agitándola dentro del medio.

El crecimiento de estos medios se manifiesta de tres formas:

1. **Enturbiamiento:** una opacidad más o menos densa.
2. **Formación de velo:** pequeña masa de células que flota en la parte superior del cultivo.
3. **Sedimento:** depósito celular que permanece en la parte inferior del cultivo.



Forma correcta de sostener los tubos y tapones durante la resiembra.

IDENTIFICACION -

Ventajas .-

Es la forma más conveniente del diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas, mediante este procedimiento se determina el género y la especie bacteriana causante del problema.

Desventajas .-

Requiere de tiempo, equipo, conocimiento y experiencia. El personal de laboratorio que realice la identificación, debe tomar un amplio conocimiento de los métodos y técnicas utilizados para cada género en particular. Puede ser peligroso para el personal inexperto en el área de diagnóstico microbiológico.

Métodos .-

Existen tablas o cuadros bioquímicos en los cuales se comprueba el resultado de las reacciones y son la base en la identificación de los diferentes agentes bacterianos.

Las pruebas biológicas pueden ser otra forma de identificación, por medio de antisueros se determina específicamente el tipo de bacteria de que se trata (ejemplo: serotipificación de Salmonella spp. Brucella, etc.) por otro lado, por medio de bacterias (antígeno) conocidas, es posible determinar la presencia en la muestra (suero, orina, etc.) de los anticuerpos específicos al germen sospechoso (leptospirosis en orina, brucelosis en suero o leche, etc)

Para la identificación de las bacterias, el laboratorio de diagnóstico necesita conocer las características físicas y metabólicas de las mismas. Dentro de las características físicas, se toman en cuenta: agrupación, reacción a la tinción de Gram y algunas otras particularidades estructurales que se pueden apreciar con tinciones específicas, así como la morfología de las colonias observadas en las placas de agar.

Conocidas las características físicas del microorganismo, se analizan sus reacciones metabólicas tales como: la producción de enzimas, metabolitos intermediarios, oxidación y fermentación entre otras.

Esto se logra a través de pruebas estandarizadas que se elaboran a partir de preparados comerciales que son medios de cultivo contienen

do el compuesto por el cual las enzimas bacterianas actúan e indicadores que ponen en manifiesto la reacción que se llevó a cabo.

Al estudiar el metabolismo bacteriano en el laboratorio, podemos dar atención primero a la localización de la acción de las diferentes enzimas, la mayoría de las enzimas se encuentran en el interior de cada célula (endoenzimas) otro grupo de enzimas no tan numerosas, se encuentran en el exterior de las células (exoenzimas) estas enzimas pueden actuar sobre las sustancias presentes en el medio ambiente de las bacterias.

Cada enzima es una proteína y por lo tanto, se fabrica bajo control genético, si un organismo hidroliza el almidón, por ejemplo, se sabe que produce una enzima capaz de llevar a cabo esta hidrólisis la cual sólo se sintetiza si el organismo cuenta con el gen adecuado; incluso factores como la susceptibilidad a un antiséptico o antibiótico se reducen a la herencia del organismo. La capacidad para utilizar las diferentes fuentes de nitrógeno y de carbono es igualmente, debida a la presencia o ausencia de una enzima (o enzimas) específica, la cual a su vez depende del material hereditario.

Las pruebas de enzima preformadas y el uso de substratos enzimáticos aislados ayudarán a acelerar la identificación de microorganismos. Una reciente introducción en el mercado, el sistema A.P.I. constituye un ejemplo de la disponibilidad de un sistema de multipuebas por micrométodo para Enterobacteriaceas. Se introduce un inóculo de fase logarítmica del organismo a prueba en 20 aberturas, después de ser incubado toda la noche, se leen los resultados, algunas de las pruebas requieren la adición de reactivos, pero el método es rápido, económico en términos de tiempo, espacio y conveniencia y se afirma que es capaz de diferenciar enterobacterias con una precisión del 90 al 95% dependiendo del inóculo.

Cualquier método adaptado, ya sea el tradicional o el moderno, hace incapil en la importancia de un cultivo puro.

Los métodos incluido en este manual no son evidentemente los únicos recomendables, han sido empleados por algunos autores e investigadores responsables. Cada laboratorio puede hacer mejorar o modificar las técnicas recomendadas para acomodarlas mejor a cada situación particular, otras reacciones se encuentran en las publicaciones que se incluyen en la bibliografía.

METODO DEL PORTAOBJETOS

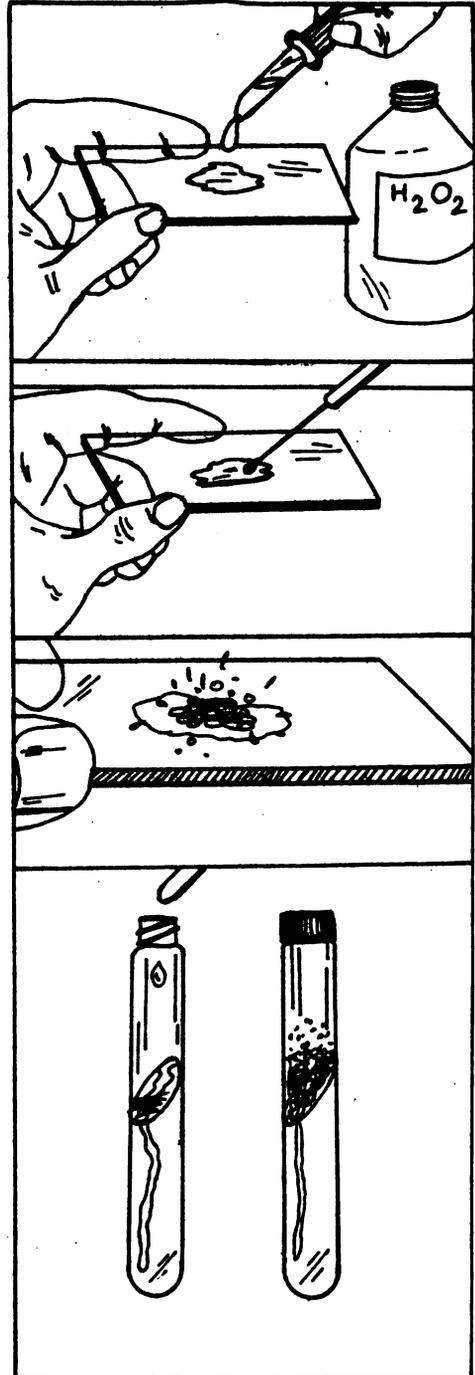
Agregar una gota del reactivo al 30% sobre la colonia de microorganismos del portaobjetos. Usar - un gotero o una pipeta Pasteur.

Mezclar con el asa de inoculación suavemente. Por lo general, no es necesario mezclar el reactivo con el cultivo.

Se observa la inmediata formación de burbujas en una reacción positiva.

METODO EN TUBO DE ENSAYO

Agregar directamente 1 ml. de H_2O_2 al 3% a un cultivo puro sembrado en una superficie de agar inclinado, densamente inoculado.



PRUEBA DE LA LECHE CON TORNASOL

FUNDAMENTO: Diferenciar organismos sobre la base de sus múltiples reacciones metabólicas en un medio lácteo.

BASES BIOQUIMICAS

La leche tornasolada es un medio diferencial que se emplea para determinar varias funciones metabólicas de un organismo: fermentación de la lactosa, caseólisis y coagulación de la caseína.

El tornasol incorporado a la leche es un indicador del pH y un indicador Redox (oxidación-reducción) que hace que el medio pueda indicar diversas funciones. La leche sola contiene el hidrato de carbono lactosa junto con tres importantes proteínas: caseína, lactalbúmina y lactoglobulina. Por lo tanto, un organismo puede mostrar una o varias propiedades metabólicas, cada una propia de una especie determinada, ayudando así a la identificación bacteriana.

FERMENTACION DE LA LACTOSA

El tornasol como indicador de pH es rojo en solución ácida (pH 4.5) y azul en condiciones alcalinas (H: 8.3). La leche tornasolada presenta un color azul púrpureo (pH: 6.8) cuando no está inoculada, pero si un organismo es capaz de fermentar la lactosa, produciendo principalmente ácido láctico, se produce una condición ácida indicada por el cambio de color del medio, que se vuelve rojo rosado. Ciertas bacterias que forman álcalis no fermentan lactosa, pero actúan sobre las sustancias nitrogenadas que se encuentran en la leche liberando amoníaco, y dando en consecuencia un pH alcalino que se manifiesta por un color púrpura azulado.

Lactosa.....glucosa	+	galactosa
		ácido láctico
Glucosa.....ac. pirúvico		ácido butírico
		CO ₂ + H ₂

FORMACION DE UN CUAJO (COAGULO)

La otra forma de coágulo es el cuajo, es el proceso que ocurre por la conversión de la caseína en paracaseína por las enzimas renina, pepsina o quimitripsina contenidas en la leche.

La renina provoca en cuajado de la leche convirtiendo la sal de caseína soluble (caseinato de calcio) en una paracaseína insoluble (paracaseinato de calcio) que es el cuajo o requesón.



La paracaseína es precipitada como paracaseinato de calcio por arriba de un pH de 4.5; este cuajo es blando, insoluble, no se disuelve en condiciones de alcalinidad y se separa de las paredes del tubo después de algunas horas, dando un líquido residual claro que se denomina "suero".

FORMACION DE GASES

Los gases (CO_2 y H_2) se forman como resultado de la fermentación de la lactosa. Se produce una fermentación turbulenta cuando hay abundancia de gases que descomponen un coágulo ácido.

MEDIO DE LECHE TORNASOLADA (PH:6.8)

Es un medio diferencial líquido de color azul púrpuro, se siembra por agitación del asa y contiene lactosa, galactosa, trazas de glucosa, caseína, sales minerales, y tornasol como indicador de pH 18.

PROCEDIMIENTOS

Inocular un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación.

En caso de Clostridium agregar hierro estéril por ejemplo, polvo de hierro, limaduras de metal o clavos al tubo.

Incubar a $35-37^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas; puede ser necesarios períodos más largos, hasta 14 días.

REDUCCION DEL TORNASOL

El tornasol es un indicador del pH y un indicador de oxidación - reducción. Algunos organismos son capaces de reducir el tornasol a una leucobase (blanca).

FORMACION DE COAGULO Y DIGESTION

Las enzimas proteolíticas provocan la hidrólisis de las proteínas de la leche de lo que resulta su coagulación: la enzima responsable de la formación de coágulo es la renina. La formación de coágulo en la leche tornasolada es causada por: una precipitación de la caseína por la formación de ácidos, o por la conversión de la caseína en paracaseína por la enzima renina.

FORMACION DE UN COAGULO ACIDO

La precipitación de la caseína provocada por los ácidos orgánicos a partir de la lactosa en condiciones ácidas, produce un coágulo firme, gelatinoso que no se separa de las paredes del tubo y es fácilmente disuelto cuando es sometido a condiciones alcalinas. La lactosa es fermentada dando ácido láctico y otros ácidos orgánicos como productos finales de la glucólisis, éstos a su vez, se combinan con el caseinato de calcio, sal soluble en agua, para dar caseinógeno que precipita en forma de coágulo insoluble.

Lactosa.....ácido láctico

Ácido láctico + caseinato de Ca . caseasa..... Caseinógeno
(medio ácido) [sal soluble] [insoluble]

DIGESTION (PEPTONIZACION)

La hidrólisis de la caseína por la actividad enzimática produce una conversión final del precipitado caseinógeno en un líquido claro; el proceso se denomina peptonización, y se manifiesta por una aclaración acuosa del medio causada por la digestión del precipitado (coágulo) y las proteínas de la leche por las enzimas proteolíticas. Solo se produce peptonización cuando la bacteria en prueba contiene la enzima proteolítica caseasa.

RESULTADOS :

ROJO ROSADO (A)
REACCIÓN ACIDA
FERMENTACION DE LA LACTOSA

AZUL PURPUREO (SC)
No hay fermentación de la lactosa
No hay cambio en el indicador de pH

AZUL (ALK)
Reacción alcalina
No hay fermentación de la lactosa
Metabolismo de sustancias nitrogenadas

BLANCO (RED)
Reducción del tornasol a una Leucobase

DIGESTION (PEPTONIZACION) (D)
FORMACION DE COAGULO O CUAJO (C)
Coagulación de la proteína de la leche

GAS (CO₂ y H₂) (G)
Burbujas en el medio
El coágulo puede desintegrarse

FERMENTACION TURBULENTA (T)
El coágulo ácido es fragmento por la abundante producción de gas.

METODO DE LA GOTA SUSPENDIDA

PROCEDIMIENTO.-

Es un método muy sencillo y satisfactorio que puede realizarse rutinariamente en cualquier laboratorio de bacteriología.

En esta técnica deben guardarse precauciones excesivas ya que se trata de una gota colgante, la cual no tiene contacto alguno con el portaobjeto.

TECNICA.-

Se utiliza un cubreobjeto con cuatro burbujas de vaselina sólida (algunos técnicos prefieren el uso de plastilina) en los extremos, se coloca una asada llena de organismos en la fase logarítmica sobre la mitad del cubreobjeto y se desciende un portaobjeto sobre ella, se invierte la preparación y se examina con los objetivos de 4 y 10 mm³³.

Es importante que esté parcialmente cerrado el diafragma del microscopio ya que una iluminación demasiado brillante hace casi imposible la observación de los organismos.

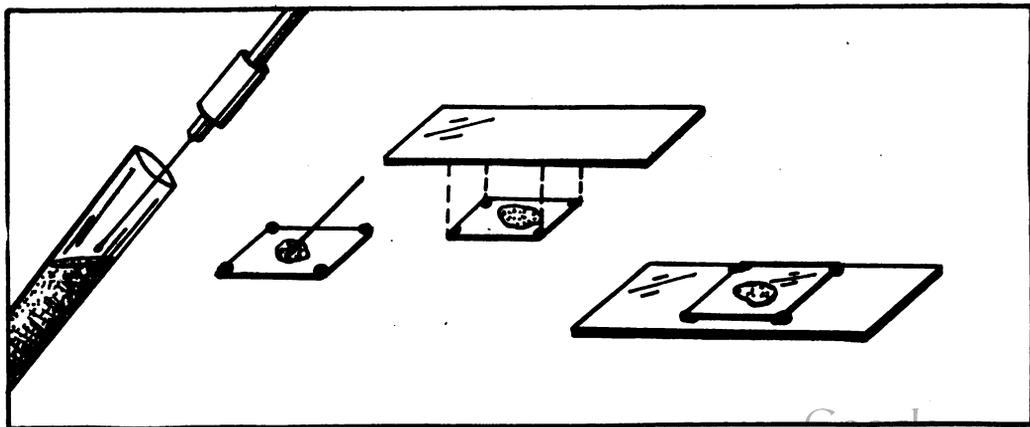
Por razones de seguridad, se recomienda el anillar el cubreobjeto por completo.

RESULTADOS:

Prueba positiva: sin desplazamiento, o movimiento Browniano, en el cual las células oscilan con ligereza debido al bombardeo molecular, también debe excluirse la falsa movilidad debida a corrientes de convección.

Exceptuando algunas cepas de Streptococcus faecalis en las concentraciones elevadas de proteínas, ningún coco de importancia médica es móvil.

Los anaerobios presentan problemas especiales en donde la motilidad puede ser inhibida por el aire en las preparaciones de "gota suspendida", es más probable que se observe la motilidad de los clostridios en las preparaciones de cultivos de carne cocida montados en tubos capilares cerrados en cada extremo utilizando algún sellador y examinarse nuevamente después de 30 minutos de incubación.



METODO DE DILUCION EN TUBO DE ENSAYO

El método requiere utilizar soluciones antimicrobianas originales; pueden obtenerse en el mercado o de diversos fabricantes - farmacéuticos partidas de fármacos cristalinos de potencia conocida.

PROCEDIMIENTO .-

Preparar las soluciones originales que contengan 1.000 g. o U/ml en agua destilada estéril. Solubilizar con los disolventes apropiados o bien ajustando el pH, si es necesario. Si es preciso, esterilizar también mediante filtración a través de una membrana estas soluciones pueden congelarse a 20°C en recipientes individuales herméticamente cerrados de 6 a 8 semanas sin pérdida de su potencia.

Para cada uno de los agentes que han de ensayarse, preparar en una gradilla una serie de 10 tubos de ensayo estériles, añadir a cada uno de los últimos 9 tubos de la serie 0.5 ml. de caldo de cultivo. Puede utilizarse para ello soya con tripticasa, tioglicolato o caldo de infusión enriquecido con fluido ascítico o sangre de conejo, según los requisitos de crecimiento del organismo que se desea ensayar.

Añadir a continuación 0.5 ml. de la solución de trabajo del antibiótico generalmente 100 U/ml. a los dos primeros tubos, mezclar transferir 0.5 ml. del tubo 2 al tubo siguiente y continuar este proceso hasta llegar al tubo número 9, del cual se desechan 0.5 ml. El tubo número 10 actúa como control del cultivo.

Preparar una solución 1: 1000 en un caldo, de un cultivo incubado por 18 horas del organismo que ha de probarse. En los casos de organismos de crecimiento lento o delicados, debe utilizarse una dilución de 1:100. Añadir 0.5 ml. de esta solución durante 12 a 18 horas a 35-37°C.

RESULTADOS .-

Examinar macroscópicamente los tubos. La concentración mínima inhibitoria (M.I.C.) es la dilución máxima del antibiótico en el último tubo que no muestra crecimiento visible y se expresa -

en unidades o microgramos por mililitro.

Para determinar la concentración bactericida mínima, cada uno de los tubos claros se subcultiva en un medio adecuado en cajas de agar.

Esta técnica debe modificarse para agentes como las sulfamidas, ácido nalidíxico y nitrofurantoína.

GLOSARIO EMPLEADO PARA LA DETERMINACION DE SENSIBILIDAD

SENSITIVA (S):

En infecciones no complicadas, se pueden esperar que el microorganismo infectante sea inhibido por concentraciones fácilmente obtenidas en la sangre con los esquemas usuales de dosificación.

RESISTENCIA (R):

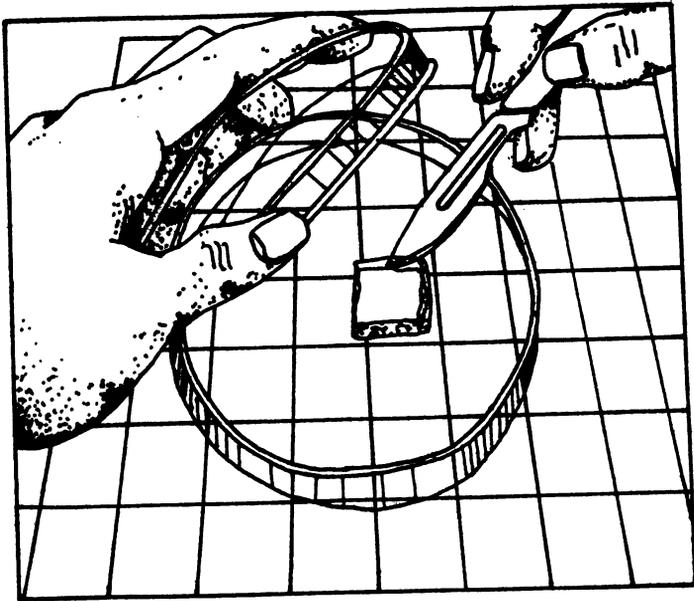
El microorganismo infectante no es inhibido por la concentración del antibiótico obtenida en la sangre.

INTERMEDIA (I):

Se aplica cuando el microorganismo se encuentra entre sensible y resistente. En la conducción de tratamientos deben considerarse cuidadosamente la dosis y el sitio de la infección, junto con las posibles "C.I.M.S.", in vitro, para poder calcular tanto el grado de sensibilidad como la dosis.

Este método no debe aplicarse para determinar sensibilidades a las sulfonamidas. Tampoco resulta aplicable para determinar la susceptibilidad de organismos de lento crecimiento que requieren CO₂ de anaerobios también el lento crecimiento, como los Bacteroides, puesto que los resultados no pueden ser interpretados adecuadamente.

M I C O L O G I A



COLECCION DE MUESTRAS PARA LA DEMOSTRACION Y AISLAMIENTO DE LOS HONGOS PATOGENOS

Los procedimientos de diagnóstico en Micología Médica están encaminados directamente a la demostración y al aislamiento de los hongos presentes en los tejidos y en los líquidos corporales. El diagnóstico de laboratorio por lo tanto, no puede realizarse de una manera adecuada si las muestras clínicas remitidas al mismo, no son las recomendables o fueron obtenidas sin tomar las medidas asepticas adecuadas.

Para el diagnóstico de las micosis, pueden remitirse al laboratorio diversas muestras según el tipo de infección y la región afectada.

MICOSIS EXCLUSIVAMENTE TEGUMENTARIAS

Los hongos que provocan micosis superficiales en los animales se localizan generalmente en el tejido muerto (queratina). Las muestras obtenidas en el caso de las dermatofitosis son los raspados cutáneos, pelo afectado, uñas, lana, y plumas en el caso de aves. El raspado cutáneo debe realizarse del borde de las lesiones que muestren actividad, previa desinfección del área.

MICOSIS INICIALMENTE TEGUMENTARIAS

La micosis inicialmente tegumentarias comprenden: la Candidosis, Rinosporidiosis, los Micetomas y la Esporotricosis. El material clínico que puede ser remitido al laboratorio en el caso de estas infecciones, incluye: los raspados cutáneos, costras y pus obtenida de abscesos abiertos, exudados que fluyan de las lesiones localizadas y ganglios regionales, exudados obtenidos por aspiración y, muestras obtenidas por biopsia.

MICOSIS SECUNDARIAMENTE TEGUMENTADAS

Las infecciones por hongos que afectan en forma sistemática al organismo, pueden ser diagnosticadas mediante el examen de muestras tales como sangre, líquido cefalorraquídeo, esputo, exudados provenientes de abscesos y ganglios regionales, raspados del borde de lesiones y úlceras, tejidos obtenidos por biopsia, y tejidos obtenidos durante la necropsia.

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Dentro de los procedimientos de laboratorio para establecer un diagnóstico presuntivo de las micosis, el método más sencillo, consiste en realizar un examen directo de la muestra sobre un portaobjetos utilizando una solución aclaradora de hidróxido de potasio al 10 o 20%. Si a la observación microscópica el resultado es negativo, no se debe descartar la posibilidad de que exista una infección micótica.

El diagnóstico definitivo del agente micótico se realiza mediante la demostración del hongo en las muestras y el aislamiento del mismo en medios de cultivo especiales. Sin embargo, no todos los casos sospechosos pueden ser diagnosticados mediante estos procedimientos, en tales situaciones, los cortes histopatológicos la inoculación de animales de experimentación, el examen radiológico (en las pequeñas especies) las pruebas inmunológicas y la técnica de anticuerpos fluorescentes, pueden ser utilizados como procedimientos adicionales en la confirmación de las infecciones por hongos.

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Raspado cutáneo .-

Para este tipo de muestras, se recomienda el examen directo utilizando una solución de hidróxido de potasio al 10 o 20%, otros métodos que pueden emplearse son las preparaciones de hidróxido de potasio + glicerina, el hidróxido de potasio y la tinción de P.A.S. El cultivo en agar C-C Sabouraud debe realizarse para la identificación del género y la especie correspondiente.

En las lesiones sospechosas de infección por Candida albicans, se deberá realizar un frotis y se procederá a teñir por el método de Gram, el resto de la muestra se inocula en una placa de agar dextrosa Sabouraud.

Pelo .-

Puede realizarse un examen directo del pelo, en el sujeto empleando la lámpara de Wood. Los pelos infectados generalmente fluorescen de un color verde amarillento. Debe tomarse en cuenta que el diagnóstico de las tiñas empleando este procedimiento no es muy confiable, ya que sólo un número limitado de dermatofitos producen un material que da dicha fluorescencia, cuando es expuesta a la luz ultravioleta. El uso de la lámpara de Wood es como un medio "pantalla" para la búsqueda de portadores asintomáticos.

En cuanto al examen en fresco de los pelos, utilizando la técnica del KOH, es importante diferenciar la forma endotrix y la ectotrix de parasitismo, en la primera se pueden observar abundantes esporas dentro del pelo y en la segunda fuera de éste rodeándolo a manera de manguillo, es importante reportar este tipo de parasitismo ya que esto tiene un gran significado epidemiológico. Otra parte de la muestra, se inocula en agar Micobiotic o bien en agar C-C Sabouraud.

Pus y Exudados .-

El examen de estas muestras puede realizarse en forma directa o bien, se pueden agregar 1 o 2 gotas de KOH al 10% para aclarar la preparación. Pueden observarse dependiendo el tipo de micosis, tubos germinales, células grandes conteniendo endosporas o bien, gránulos de azufre.

Los frotis de pus se debe teñir por el método de Gram para demostrar fragmentos de hifas, pseudomicelios o estructuras tubulares, las cuales tienen afinidad por el colorante básico. Los gránulos de azufre pueden ser tratados por el método de ácido resistentes.

Las muestras remitidas en recipientes estériles se destinan para la inoculación de medios de cultivos específicos.

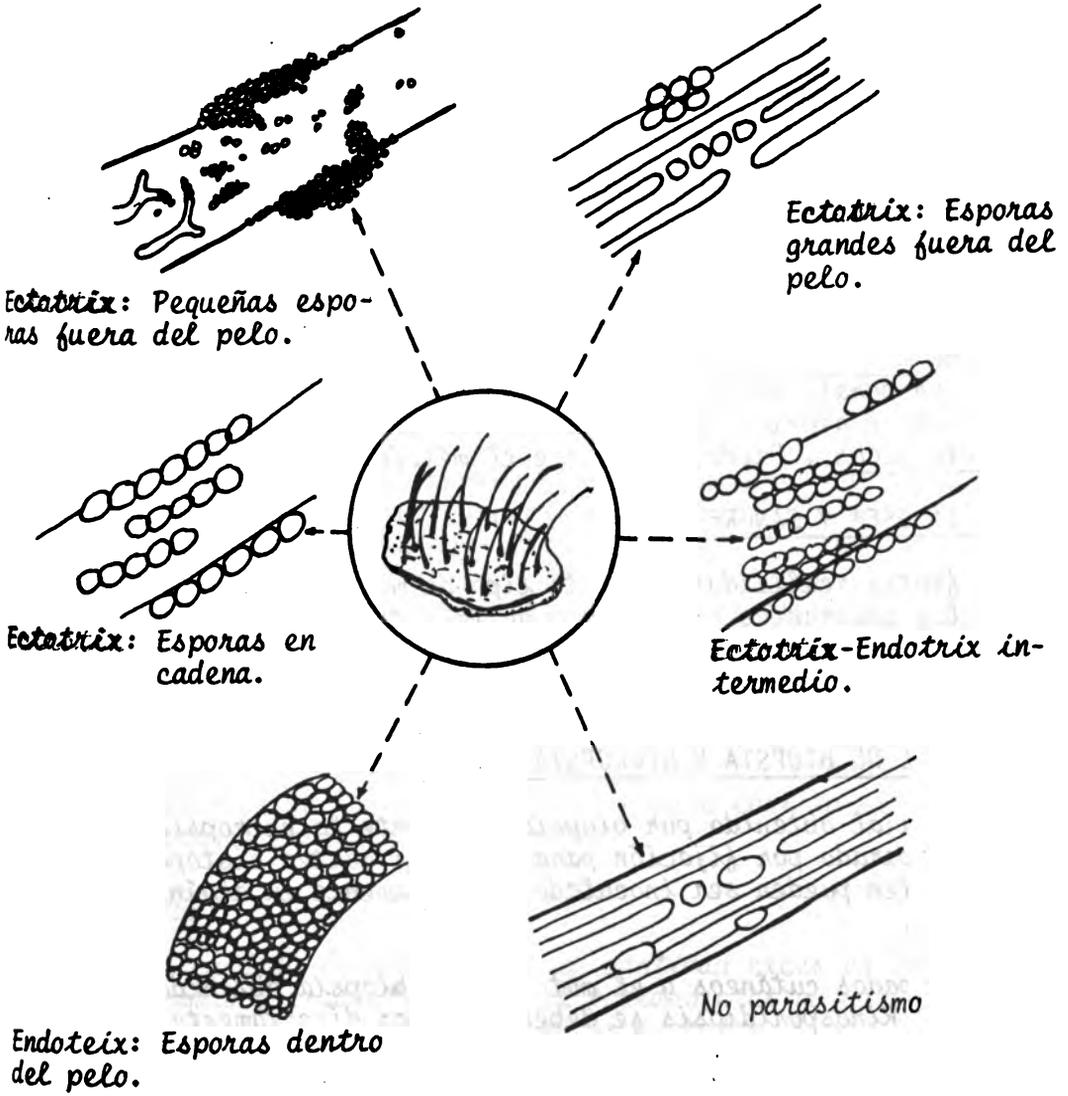
Tipo de muestras y medios indicados para el aislamiento de
de hongos causantes de micosis

ENFERMEDAD	TIPO DE MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO
<p><u>EXCLUSIVAMENTE</u> <u>TEGUMENTARIAS</u></p> <p>Dermatofitosis (Tiñas)</p>	<p>Escamas de piel Pelo afectado Raspado de uñas</p>	<p>Agar micobiótico Agar Sabouraud + C E S</p>
<p><u>INICIALMENTE</u> <u>TEGUMENTARIAS</u></p> <p>Candidosis</p>	<p>Raspado mucocutáneo Escamas de piel Raspado vaginal</p>	<p>Sabouraud + C E S y Agar Saouraud</p>
<p>Rinosporidiosis</p>	<p>Biopsia de pólipos nasales y oculares Raspado cutáneo</p>	<p>Ninguno</p>
<p>Esporotricosis</p>	<p>Pus de las lesiones ulcerativas. Líquidos aspirados</p>	<p>Sabouraud + C E S y Agar sangre</p>
<p>Mycetoma (Maduromicosis)</p>	<p>Tejido para biopsia Líquidos aspirados Pus de lesiones local.</p>	<p>Agar Sabouraud Agar BHI Agar sangre</p>

ENFERMEDAD	TIPO DE MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO
<u>SECUNDARIAMENTE</u> <u>TEGUMENTARIAS</u> (Actinomyces) Actinomicosis	Líquido espinal Pus y exudados aspirados Esputos Lavado bronquial	Agar BHI BHI con 0.2% de glucosa. Medio de carne picada, a 37°. C.
NOCARDIOSIS	Igual al anterior	Agar sabouraud Agar BH + sangre (incubado a temperatura ambiente y a 37 g. C.) Técnica de la parafina.
(Hongos Levaduriformes) Criptococcosis	Esputo, Orina Líquido espinal Pus de abscesos Raspados de piel lesionada	Sabouraud + Cloranfenicol. Agar de papa y Dextrosa/Urea-antibióticos. Medio de creatinina. (a 24 g. y 37 g. C.) Medio de Níger
Candidosis	Lavado bronquial Líquido espinal Esputo Orina, Heces	Sabouraud + C ESS Agar sabouraud (para las especies sensibles a los antibióticos).

ENFERMEDAD	TIPO DE MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO
(Hongos Difásicos) Coccidioidomicosis	Lavado bronquial Espujo, Orina, Líquido espinal, raspado cutáneo. Pus de absesos Senos afectados.	Sabouraud+ C E S
Histoplasmosis	Sangre, esputo médula ósea, lavado bronquial, líquido espinal, pus de senos afectados y úlceras. Raspado de piel lesionada.	BHI + antibióticos Agar sangre de Sabhi + antibióticos BHI + 6% de sangre cultivado a 37g C.
Blastomycosis Norteamericana	Raspado de la periferia de las lesiones. Orina, Espujo, Pus de Absesos y heridas. Lavado bronquial	Sabouraud + C E S Agar BHI + antibióticos. BHI (sin antibióticos) a 37g C y Agar de Shabi a 37g C.
Blastomycosis Sudamericana	Biopsia de nódulos linfáticos. Raspado de mucosas Espujo Lavado bronquial Raspado de la periferia de las lesiones.	Igual al anterior

ENFERMEDAD	TIPO DE MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO
<u>MICOSIS</u> <u>MISCELANEAS</u> Aspergilosis	Espuito Lavado bronquial Feto y placenta	Agar Sabouraud + antibióticos
Micomicosis	Tejido para biopsia Feto y placenta Espuito Lavado bronquial	Agar sabouraud + cloranfenicol



LIQUIDO ENCEFALORAQUIDEO

El líquido obtenido en tubos o jeringas estériles, es centrifugado a 2000-2500 rpm. durante 15 minutos y el sedimento se observa al microscopio, donde pueden observarse células o tubulares; otra parte del sedimento se tiñe para demostración de cápsula cuando se sospecha de una infección por Cryptococcus neoformans, utilizando la técnica de la tinta china o la tinción de nigrosina.

El sedimento puede tratarse por el método de Gram y también por el método de ácido resistentes, en el caso de infección por Actinomyces.

ESPUTO .-

Los frotis de esputo son tratados de manera similar a los de pus y exudados. La tinción de Gram es útil para demostrar hifas de Actinomyces células levaduriformes de Candida albicans y artrosporas, la tinción de ácido resistentes nos ayuda a identificar el género Nocardia; si se sospecha de infección por Cryptococcus. Puede utilizarse el método de la tinta china.

MEDULA OSEA Y SANGRE .-

Los frotis realizados con este tipo de material, son teñidos con los colorantes de Giemsa y de Wright en los casos agudos de Histoplasmosis, las muestras provenientes de jeringas son inoculadas directamente en un medio de cultivo adecuado.

MATERIAL DE BIOPSIA Y NECROPSIA

El material obtenido por biopsia o durante la necropsia puede ser preparado por fijación para realizar cortes histopatológicos o bien pueden ser inoculados directamente en algún medio de cultivo.

Los raspados cutáneos y el material de biopsia obtenidos en el caso de Rinosporidiosis se deben examinar directamente o fijarse para histopatología. El cultivo en forma micelial no puede ser llevado a cabo en el laboratorio, ni los animales de laboratorio han sido infectados experimentalmente. Sin embargo, Grover (1970) obtuvo la maduración de las esporas y esporangios en material de biopsia colocado en el medio sintético.

EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO .-

El examen microscópico de las preparaciones en frasco no teñidas tales como orina, exudados y líquidos peritoneales o pleurales - pueden demostrar la presencia de estructuras características, (esporas, esferulas, hifas, etc.) en la mayoría de los casos.

TECNICA DEL KOH AL 10% .-

Las preparaciones utilizando una solución aclaradora de hidróxido de potasio al 10 o 20%, son un método rápido y confiable para el diagnóstico de las tiñas, cuando examinamos muestras de pelo o raspados cutáneos. Este procedimiento también puede ser aplicada a muestras tales como pus y exudados.

En el examen microscópico del material biológico, pueden identificarse los filamentos de los dermatófitos que pueden ser largos, cortos, ramificados, fragmentados y de un diámetro regular de 3-micras; es importante el saber diferenciarlos de filamentos de hongos contaminantes o de artefactos diversos.

El material debe primero examinarse a bajo aumento con el diafragma parcialmente cerrado para obtener contrastes visual, examinando el material se debe enfocar primero un pelo que aparezca roto o deformado y observarse a mayor aumento. En el tejido que es examinado se encuentran con mayor frecuencia esporas, más bien que hifas, las cuales generalmente están dispuestas en racimos (mosaico) o en cadenas sobre la superficie del pelo.

Las ventajas del método microscópico directo para el diagnóstico - sobre los otros procedimientos es de que en un corto período se puede establecer un diagnóstico definitivo e instituirse la terapia desde el examen inicial del paciente.

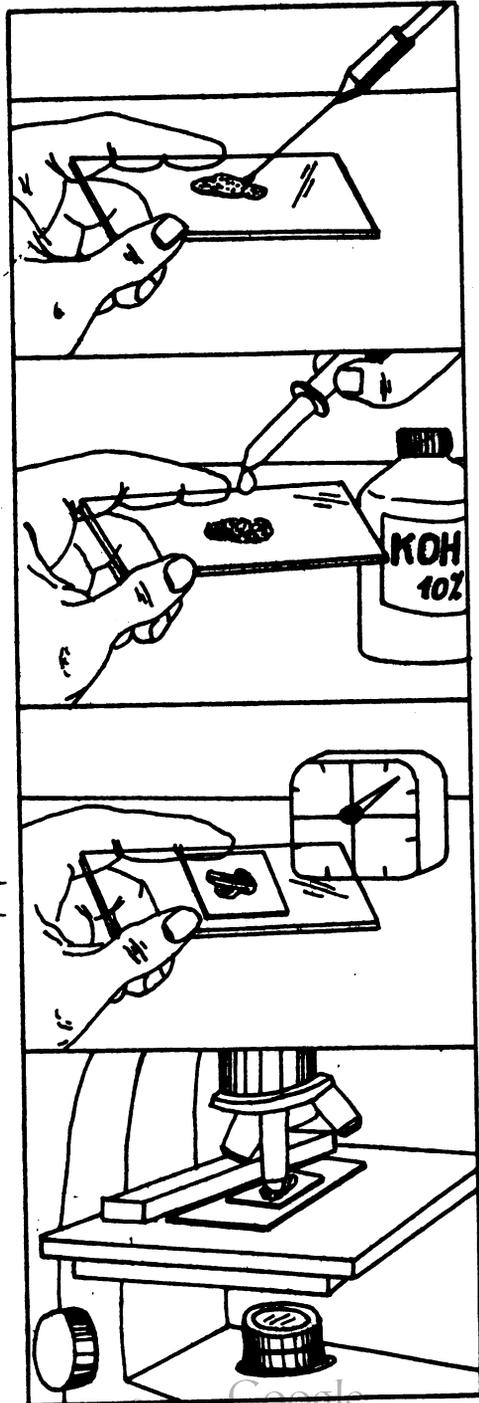
PRECAUCIONES :

Debe tener cuidado en no colocar una cantidad excesiva de muestra (pelos, escamas o exudados) sobre el portaobjetos ya que esto puede impedir la observación de los elementos fungales.

En términos generales, mientras más tiempo permanezca el material en el hidróxido de potasio, es más exacto el examen; el dejar reposar las preparaciones durante toda la noche en una cámara húmeda facilita ampliamente la observación de las estructuras.

PROCEDIMIENTO .-

1. Frente al mechero y sobre un portaobjetos, se deposita una pequeña cantidad de pelos y escamas raspadas de la periferia de la lesión.
2. Se agrega 2 o 3 gotas de una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10 o 20%.
3. Se deja en reposo la preparación durante 10 o 15 minutos, antes de colocar el cubreobjetos; un calentamiento ligero de la laminilla acelera el aclaramiento de las muestras.
4. Observar al microscopio con el objetivo seco fuerte (40 X) para la identificación de estructuras.



CULTIVO DE LOS HONGOS .-

Los hongos obtienen su alimento como parásitos infectando organismos vivos o como saprófitos atacando sustancias orgánicas muertas. La mayoría de los hongos conocidos, parásitos o no, son capaces de vivir sobre materia orgánica muerta, como lo demuestra el hecho de poder cultivarlos artificialmente sobre medios sintéticos.

La mayoría de los hongos se desarrollan entre los 0° y 35°C, pero las temperaturas óptimas están entre 20° y 30°C. En contraste con las bacterias, los hongos prefieren un medio ácido para su crecimiento, siendo el óptimo alrededor de pH 6.0 para la mayoría de los géneros.

Existen una gran variedad de medios de cultivo específicos para cada género, y aún, para cada especie de hongo, pero las cajas o los tubos con Agar dextrosa Sabouraud (pH 5.6) son el medio estándar utilizado para el aislamiento de los hongos: pueden además emplearse cajas preparadas con agar de infusión cerebro-corazón (agar BHI) o agar sangre adicionados o no con antibióticos para favorecer el desarrollo de las formas miceliales y levaduriformes.

El sembrado de las placas y tubos conteniendo el medio de cultivo, se realizan empleando un asa de inoculación en forma de L o bien utilizando el asa bacteriológica. La técnica generalmente es similar a la recomendada para Bacteriología general; sin embargo, como en el caso de las dermatofitosis, la muestra es inoculada por picadura en sitios diversos del medio de cultivo.

El examen de los medios de cultivo inoculados con material clínico, varía dependiendo del género en cuestión. Los hongos levaduriformes requieren de una incubación de 24 horas a 37°C (como las bacterias) por el contrario, las formas miceliales requieren de un período de incubación más prolongado, que varía de una a tres semanas a temperatura ambiente.

Las características generales que nos permiten realizar una identificación preliminar de los hongos en cultivo, las podemos agrupar en dos formas:

1) Morfología Colonial .-

Es importante observar para todos los tipos de crecimiento:

- a) Aspecto de la colonia
- b) Morfología general (plana, agrupada, con pliegues regulares o irregulares).
- c) Textura: Levaduriformes, pulverulente, granular, vellosa o algodonosa.
- d) Tiempo de crecimiento o desarrollo
- e) Pigmentación y la difusión del pigmento al reverso de la colonia.

2) Tipos de Micelio :

Uicelular

Pseudomicelio
Pigmentado
Hialino

Filamentoso

Macrosifonado	Septado
Microsifonado	Pigmentado
Cenocítico	Hialino

Las características macroscópicas de las colonias y la pigmentación son medios útiles para la identificación, pero en la identificación final se hace necesario el desarrollo pleno de todas sus estructuras para así realizar una apreciación exacta de ellas.

Va que el estudio de la morfología de las esporas y las relaciones espora-micelio son necesarias para la identificación final del hongo. Los micólogos en ocasiones suplementan sus cultivos, mediante el cultivo del hongo en portaobjetos, utilizando en método del microcultivo el cual permite un estudio exacto de los hongos miceliales.

METODO DEL MICROCULTIVO .-

En estos cultivos el crecimiento se realiza en una cámara húmeda preparada con una rodaja de papel filtro que se coloca en el fondo de una caja de Petri, una varilla de vidrio doblada, un portaobjetos y cubreobjetos. Este paquete se esteriliza en el autoclave y se almacenas hasta ser utilizado.

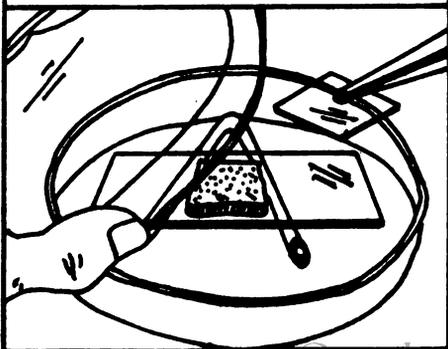
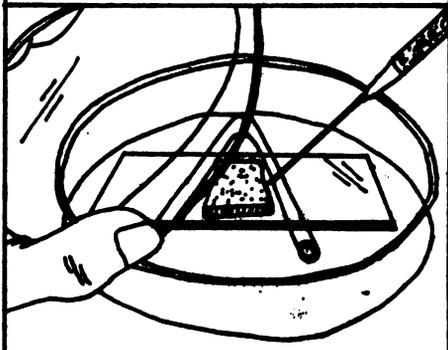
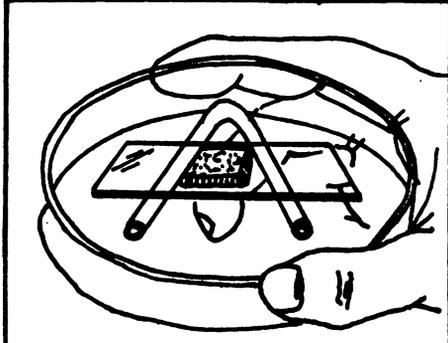
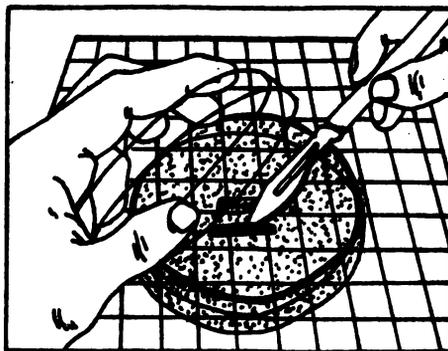
PROCEDIMIENTO .-

Preparar una placa con 30-35 de medio. Se corta un bloque de aproximadamente 1 cm² utilizando material y técnicas -
estépticas.

Se transfiere el bloque de agar a la superficie del portaobjetos.

Se inoculan los cuatro lados del bloque de agar con las esporas o el crecimiento micelial del hongo que se está estudiando.

Se coloca un cubreobjetos utilizando unas pinzas previamente flameadas encima del bloque, haciendo una ligera presión.

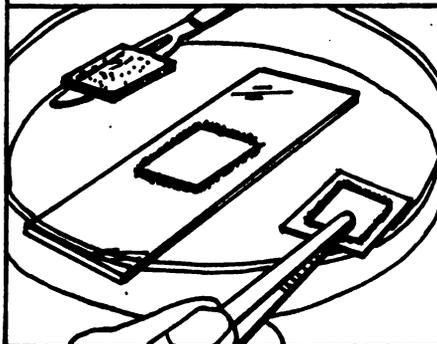
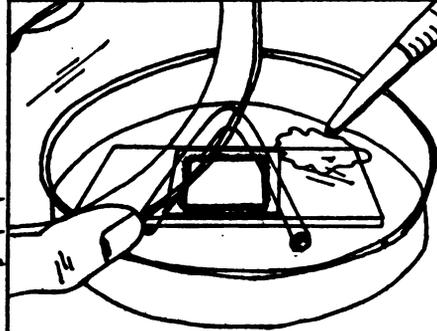
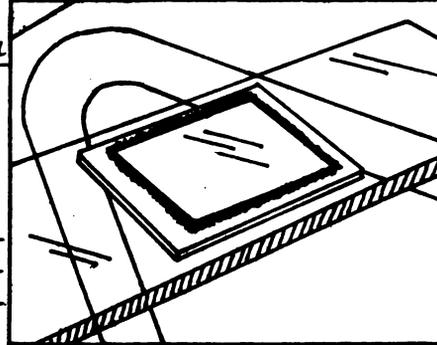
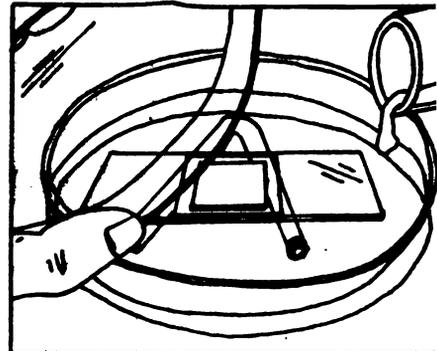


Se adicionan aproximadamente 10 ml. de agua destilada estéril o una solución al 10% de glicerina estéril - teniendo cuidado de que el nivel de líquido no toque el portaobjetos.

Se incuba el microcultivo a 27°C hasta observar sobre el medio el desarrollo del micelio. Cuando el micelio toque tanto el porta como el cubreobjetos, puede realizarse su observación.

Antes de observar se retira el agua destilada con pipeta y se sustituye por formol al 10% (10ml). se deja actuar por espacio de 2 a 24 horas.

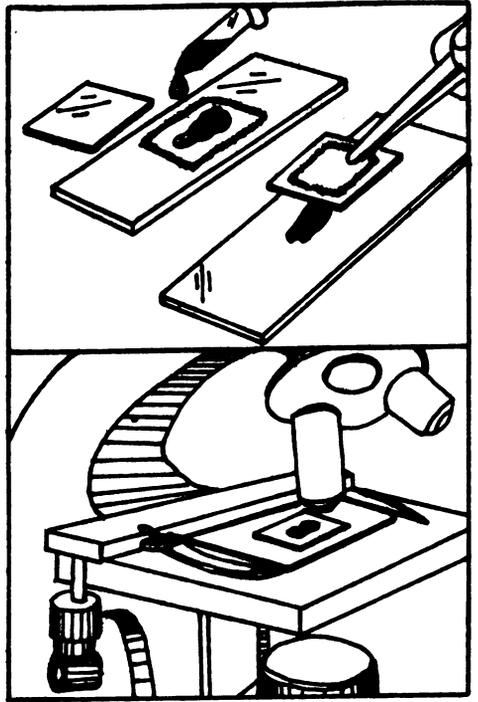
Posteriormente se retira el medio de cultivo con un bisturí previamente flameado y obtenemos el hongo sobre el porta y cubreobjetos.



Para el examen se agregan 1 o 2 gotas del colorante azul de algodón lacto - fenol en un portaobjetos limpio y se coloca el cubreobjetos del microcul - tivo en el colorante; por otro lado, - al portaobjetos del microcultivose le agrega el colorante y un cubreobjetos limpio.

Para el examen microscópico, se obser - va primero con bajo aumento y después - con el objetivo de inmersión.

Con éste procedimiento se obtienen dos hermosas preparaciones, con el micelio, esporas y conexiones intactas; estas preparaciones pue - den hacerse semipermanentes sellando los bordes de los cubreobje - tos con barniz para uñas.



TECNICAS DE TINCIÓN :

Los métodos de tinción utilizados para la demostración de los hongos incluyen la tinción de Gram, el método de Ziehl-Neelsen y la modificación de Kinyoun (para ácido-resistentes) así como la tinción para cápsula. Estas tinciones se describieron con anterioridad en el capítulo correspondiente a Bacteriología, en esta ocasión describiremos algunas de las técnicas rutinarias empleadas en el laboratorio de Micología general.

TINCIÓN CON AZUL DE ALGODÓN LACTOFENOL :

Esta es una excelente preparación para la demostración de la mayoría de los hongos miceliales.

REACTIVOS :

Solución A: Solución Aclarante (Lactofenol)

Cristales de Fenol	20 g.
Acido Láctico	20 g.
Glicerina	40 g.
Agua Destilada	20 ml.

Disolver en el agua destilada el fenol en baño María, agregar el ácido Láctico.

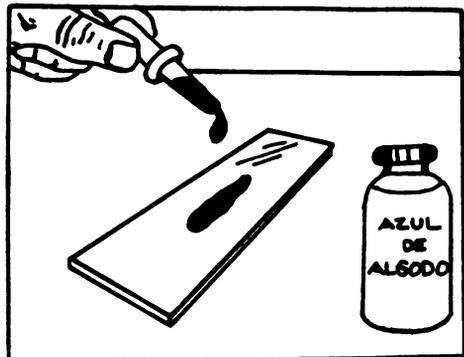
Solución B: Azul de Algodón Lactofenol

Colorante Azul de Algodón	0.05 g.
---------------------------------	---------

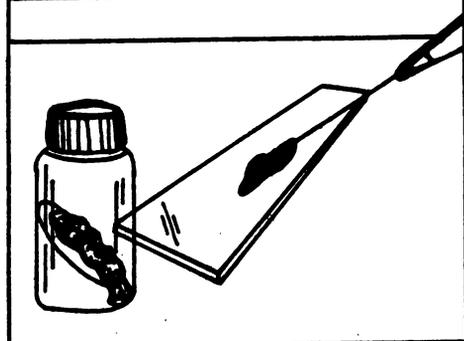
A los 60 ml. del aclarante anterior se le adiciona el colorante azul de algodón y se filtra antes de usarse.

PROCEDIMIENTO :

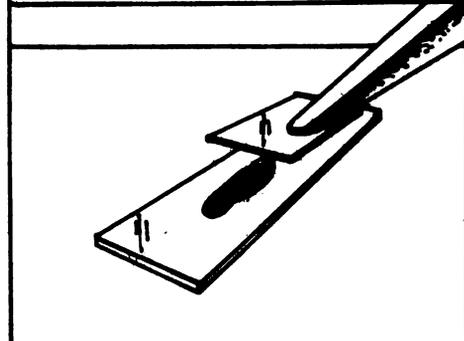
Poner un portaobjetos sobre una superficie transparente e iluminada, si esto no es posible, poner el portaobjetos sobre una hoja de papel blanco. Agregar una pequeña gota de azul de algodón-lactofenol en el centro del portaobjetos.



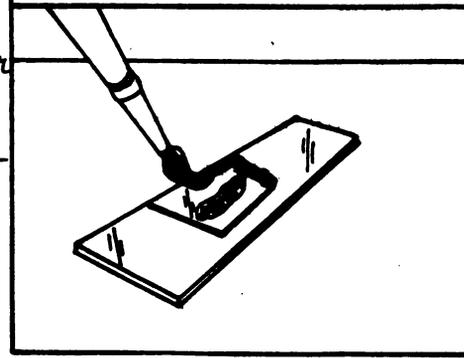
Remover un fragmento de la colonia del hongo (aproximadamente - 1 a 2 mm. dentro de la periferia) con un asa y depositar sobre la gota, del colorante.



Desbaratar el fragmento de la colonia utilizando el asa de inoculación o aguja de disección.



Montar la preparación dejando caer un cubreobjetos sobre ella, no presionar el cubreobjetos porque esto podría desprender algunas estructuras del hongo.



TINCION CON AZUL DE ALGODON ACETICO :

REACTIVOS :

Azul de algodón 0.5 g.
Acido acético 3.0 g.
Agua destilada 100 ml.

PROCEDIMIENTO :

- Fijar con alcohol metilico cubriendo el portaobjetos y dejando evaporar. (Microcultivo).
- Agregar la solución de azul de algodón acético por 20 minutos, calentando hasra la emisión de vapores.
- Lavar rápidamente con agua corriente
- Pasar por alcohol absoluto de 90°
- Pasar por alcohol absoluto
- Poner en xilol hasta que se transparente la preparación
- Montar en bálsamo de Canada o resina sintética
- Observar al microscopio empleando primero el objetivo seco - fuerte.

TINCION CON ACIDO PERYODICO DE SCHIFF (PAS)

Es una excelente tinción utilizada para demostrar hongos en muestras de raspados cutáneos y cortes de tejido.

REACTIVOS :

Solución A: Acido Peryódico 5.0 g.
Agua destilada 100 ml.

Poner en un frasco con tapón de rosca.

Solución B : Solución de fucsina básica

Fucsina básica	0.1 g.
Alcohol etílico 95%	5.0 ml.
Agua destilada	95.0 ml.

Mezclar el alcohol etílico y el agua, añadir cuidadosamente la fucsina a la mezcla y agitar la solución con movimientos rotatorios.

PROCEDIMIENTO

Poner una capa delgada de albúmina de Meyer sobre un portaobjetos limpio. Sobre ésta colocar algunos fragmentos de escamas de piel o uñas utilizando una aguja de disección. No fijar por calor. Dejar secar la preparación a temperatura ambiente durante toda la noche a 37°C por una o dos horas; si se hace indispensable se puede utilizar una placa de calentamiento a 60-65°C.

Poner el portaobjetos en alcohol etílico absoluto por 1 minuto
Secar la preparación e inmediatamente ponerla en ácido peryódico al 5% por espacio de 5 minutos.

Lavar en agua corriente por 2 minutos

Poner en fucsina básica por 2 minutos

Lavar por 2 minutos en agua corriente

Sumergir el portaobjetos en una solución de Metabisulfito de sodio, por espacio de 3-5 minutos.

Lavar en agua corriente por 5 minutos

Deshidratar pasando a través de alcohol al 70%, 85%, 95% y absoluto a intervalos de 2 minutos.

Poner en xilol por 2 minutos y montar con un cubreobjetos y resina sintética.

INTERPRETACION:

La mayoría de los hongos se tiñe de color Magenta; el material restante presenta un color rosado o rojizo.

Ocasionalmente las bacterias así como los neutrófilos pueden retener la fucsina pero no debe haber dificultad en diferenciar estas estructuras de los elementos micóticos.

MICOSIS EXCLUSIVAMENTE TEGUMENTARIAS

Las Dermatofitosis o Tiñas, son unas de las micosis frecuentes dentro del grupo de las micosis exclusivamente tegumentarias.

La Dermatofitosis es una enfermedad intertegumentaria cuyos agentes patológicos son diversos hongos denominados genéricamente dermatófitos, estos microorganismos presentan un tropismo estricto hacia los tejidos queratinizados de tal manera que cuando se encuentran en el huésped habitan y están situados en las capas más superficiales del mismo afectando la piel, uñas (garras y cuernos) y al pelo (plumas y lanas).

Los dermatófitos están comprendidos dentro de tres géneros: Microsporum, Trichophyton y Epidermophyton, con diferentes especies los dos primeros géneros y el tercero con una sola especie: Epidermophyton floccosum, el cual es un parásito exclusivo del hombre. En el cuadro se muestran las especies de dermatófitos que han sido reportados en los animales domésticos.

CLASIFICACION :

El probable lugar de origen de los dermatófitos es el suelo. Un número significativo de microorganismos han cambiado su existencia saprofítica en la naturaleza, por una existencia parasitaria en la piel animal o humana. Sobre la base preferencial de los dermatófitos; estos microorganismos pueden ser clasificados como geofílicos (afectos al suelo) o queratofílicos (afectos a la queratina). Otra clasificación de estos hongos ha sido realizada tomando en cuenta : 1) la preferencia de los microorganismos para el tejido animal o humano (zoofílicos o antropofílico); 2) la posición de las esporas fungales dentro o en la superficie del pelo (Endotrix o Ectotrix); 3) por las características del cultivo, y 4) en el hombre, la región del cuerpo que es perfectamente afectada (Tiña capitis, Tiña barbae, etc.).

La clasificación de las tiñas en base a las manifestaciones clínicas y a la localización de las lesiones, no puede llevarse a cabo en los animales domésticos ya que estas son ex-

DERMATOFITOS EN MEDICINA VETERINARIA



M. Canis	común	frecuente	reportado	ocasional	reportado
M. Distortum	frecuente	reportado	-	-	-
M. audouinii	frecuente	reportado	-	-	-
T. (M.) gallinae	reportado	reportado	-	-	-
M. gypseum	ocasional	frecuente	reportado	-	reportado común
M. Nanum	-	-	-	-	común
M. Persicolor	-	reportado	-	-	-
M. Cookei	reportado	reportado	-	-	-
M. vanbreuseghemii	-	reportado	-	-	-
T. Ajelloi	-	duboso	duboso	-	-
T. simii	-	reportado	-	-	-
T. mentagrophytes	ocasional.	frecuente	ocasional	ocasional	ocasional
T. equinum	-	reportado	-	-	-
T. Verucosum	reportado	reportado	común	ocasional	reportado
T. megninii	-	reportado	-	-	-
T. rubrum	-	reportado	-	-	-
T. violaceum	reportado	-	-	-	-
E. floccosum	-	reportado	-	-	-
M. canis	ocasional	ocasional	frecuente	común	-
M. distostum	reportado	ocasional	-	-	-



tremadamente variables. La infinita variedad de lesiones se refiere, por una parte, a la interacción del dermatófito y a la capacidad reactiva del huésped por la otra, en un extremo está el portador asintomático, como punto intermedio la lesión clásica, la cual se aprecia como una área circular de alopecia con una zona central de curación y una reacción inflamatoria en la periferia y en el otro extremo está la lesión violenta, eruptiva nodular o tumerosa referida como Kerion.

DIAGNOSTICO :

Como todas las enfermedades infecciosas, el diagnóstico definitivo de las tiñas depende de la demostración del agente causal. El diagnóstico basado en las características clínicas de la lesión es difícil con la excepción de los casos típicos de la lesión "anillada", otras dermatosis tales como infecciones bacterianas, urticaria, seborrea y tumores pueden erróneamente ser confundidas con una infección dermatofítica.

El diagnóstico de las dermatofitosis en el laboratorio, incluye los siguientes procedimientos:

Empleo de la lámpara de Wood.-

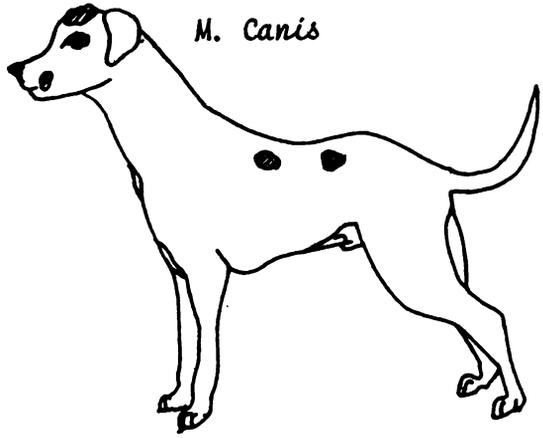
Algunos de los dermatófitos tienen la característica de fluorescer en el pelo afectado, lo cual se puede demostrar con la lámpara fluorescente de Wood, siendo esta característica un paso de ayuda en el diagnóstico. El fenómeno de fluorescencia verde amarillenta se observa infortunadamente, sólo en el caso de Microsporum canis M. distortum y M. audouinii y en ocasiones Trichophyton tonsurans y T. schoenleinii por lo tanto, el empleo de la lámpara de Wood tiene un valor diagnóstico limitado y sólo da resultados positivos en casos de infecciones por estos microorganismos.

Examen microscópico directo .-

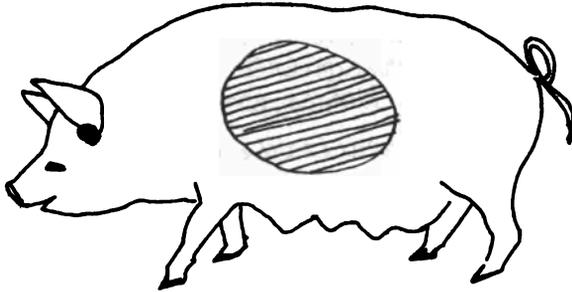
El examen microscópico del pelo o de raspados cutáneos, es un método rápido y confiable para el diagnóstico de las tiñas, previo aclaramiento o transparentamiento de la muestra utili-



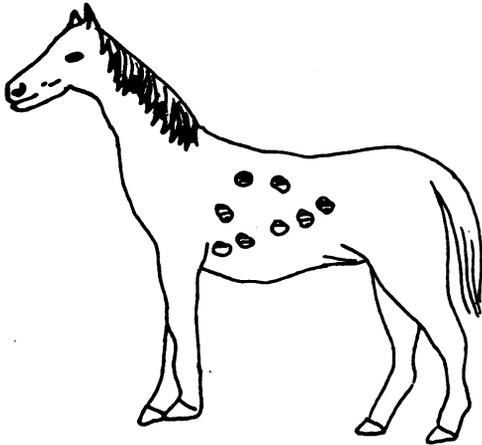
T. Verrucosum



M. Canis



M. Nanum



T. Equinum



T. GALLINAE

zando la técnica del KOH . Este examen directo nos permite apreciar las estructuras fungales y su acción en los tejidos, se observan microscópicamente arthrosporas, las cuales pueden localizarse dentro o en la superficie del pelo y fragmentos de micelio cuando examinamos raspados cutáneos, utilizando los objetivos seco débil o seco fuerte, en cambio en su estado saprofitico forman estructuras más complejas y diversas que se utilizan, precisamente para su preparación en géneros y aún en especies.

Cultivo (asilamiento).-

La identificación del género y la especie se establece por la observación de la morfología colonial tanto macro como microscópica en los medios de cultivo.

Los cultivos se realizan inoculando las muestras (pelo y escamas de piel) en medios de cultivo como el agar Micobiotic, agar Micosel o bien el medio de Sabouraud dextrosa conteniendo cloranfenicol 0.05 mg/ml. y ciclohexamida o actidiona 0.05 mg/ml. La acidez del agar Sabouraud inhibe la mayoría de bacterias; por otro lado el cloranfenicol restringe el crecimiento bacteriano y la cicloheximida inhibe la mayoría de los hongos contaminantes.

La onocilación del medio puede realizarse de la siguiente manera:

- Tomar con el asa o aguja de disección estériles algunos fragmentos de la muestra y depositarlos en el centro de 2 tubos con medio de Sabouraud dextrosa y dos con medio de Micosel agar.
- Incubar a 28°C por dos semanas. La incubación puede prolongarse hasta por 30 días.
- Observar las características macroscópicas de la comonia obtenida (no pasar por alto la pigmentación al reverso de la placa).
- Realizar un microcultivo para llegar a la identificación correcta del hongo siguiendo la técnica descrita anteriormente.

Para el desarrollo de ciertos dermatofitos es necesario el enriquecimiento del medio con vitaminas por ejemplo: Trichophyton equinum requiere de ácido nicotínico y T.verrucosum requiere tiamina e inositol, por otra parte, T.verrucosum crece mejor y más rápido a 37°C que a temperatura ambiente.

Diagnóstico preliminar de las tiñas en animales a partir del material clínico

ESPECIE	EXAMEN DIRECTO DE PREPARACIONES KOH	
DEL HONGO	Raspados de piel	Pelo
<i>Microsporum canis.</i>	Fragmento de hifas septadas y cadenas de artrosporas redondas.	Vaina en mosaico de pequeñas esporas (2-3) que rodea completamente el pelo en la base (ectrotix). El micelio dentro del pelo está dispuesto paralelamente a su longitud.
<i>Microsporum sudouinii.</i>	Micelio fragmentado y cadenas de artrosporas.	Igual a <u>M. canis</u> .
<i>Microsporum gypsum.</i>	Micelio y masa muy grandes de artrosporas, algunas en cadenas.	Esporas grandes (5-8) en cadenas o masas irregulares en la superficie de los pelos (ectrotix). El micelio está dispuesto paralelamente a su longitud.
<i>Microsporum nanum</i>	Micelio ramificado	Vaina de pequeñas esporas (2-3) que rodea el pelo en la base (ectrotix). El micelio está dispuesto paralelamente a su longitud.

zando la técnica del KOH . Este examen directo nos permite apreciar las estructuras fungales y su acción en los tejidos, se observan microscópicamente artrosporas, las cuales pueden localizarse dentro o en la superficie del pelo y fragmentos de micelio cuando examinamos raspados cutáneos, utilizando los objetivos seco débil o seco fuerte, en cambio en su estado saprofítico forman estructuras más complejas y diversas que se utilizan, precisamente para su preparación en géneros y aún en especies.

Cultivo (asilamiento).-

La identificación del género y la especie se establece por la observación de la morfología colonial tanto macro como microscópica en los medios de cultivo.

Los cultivos se realizan inoculando las muestras (pelo y escamas de piel) en medios de cultivo como el agar Micobiotic, agar Micosel o bien el medio de Sabouraud dextrosa conteniendo cloranfenicol 0.05 mg/ml. y ciclohexamida o actidiona 0.05 mg/ml. La acidez del agar Sabouraud inhibe la mayoría de bacterias; por otro lado el cloranfenicol restringe el crecimiento bacteriano y la cicloheximida inhibe la mayoría de los hongos contaminantes.

La onocilación del medio puede realizarse de la siguiente manera:

- Tomar con el asa o aguja de disección estériles algunos fragmentos de la muestra y depositarlos en el centro de 2 tubos con medio de Sabouraud dextrosa y dos con medio de Micosel agar.
- Incubar a 28°C por dos semanas. La incubación puede prolongarse hasta por 30 días.
- Observar las características macroscópicas de la colonia obtenida (no pasar por alto la pigmentación al reverso de la placa).
- Realizar un microcultivo para llegar a la identificación correcta del hongo siguiendo la técnica descrita anteriormente.

Para el desarrollo de ciertos dermatófitos es necesario el enriquecimiento del medio con vitaminas por ejemplo: Trichophyton equinum requiere de ácido nicotínico y T.verrucosum requiere tiamina e inositol, por otra parte, T.verrucosum crece mejor y más rápido a 37°C que a temperatura ambiente.

Diagnóstico preliminar de las tiñas en animales a partir del material clínico

ESPECIE DEL HONGO	EXAMEN DIRECTO DE PREPARACIONES	
	Raspados de piel	
<i>Microsporum canis.</i>	Fragmento de hifas septadas y cadenas de artrosporas redondas.	Varias hifas septadas y cadenas de artrosporas redondas.
<i>Microsporum sudouinii.</i>	Micelio fragmentado y cadenas de artrosporas.	=
<i>Microsporum gypsum.</i>	Micelio y masa muy grandes de artrosporas, algunas en cadenas.	=
<i>Microsporum nanum</i>	Micelio ramificado	=

... micelio está dispuesto ...
... longitud...

entraron
dección

ESPECIE	EXAMEN DIRECTO DE PREPARACIONES DE KOH	
DEL HONGO	Raspados de piel	Pelo
<i>Trichophyton rubrum.</i>	Micelio ramificado	La invasión del pelo es rara. En animales de experimentación se han observado cadenas de esporas fuera del pelo y micelio dentro de él.
<i>Trichophyton tonsurans.</i>	Micelio y cadenas de artrosporas.	Los fragmentos de pelo, - presentan en su interior masas densas de color oscuro las cuales corresponden a esporas de gran tamaño (4-7.5) micras en cadena.
<i>Trichophyton verrucosum.</i>	Micelio y cadenas de artrosporas.	Vainas o cadenas aisladas de grandes esporas (5-10) en la superficie del pelo (extrotix).
<i>Trichophyton equinum</i>	Micelio y cadenas de artrosporas	Vainas o cadenas aisladas de esporas (3.5-8) en la superficie del pelo (extrotix) Micelio dentro del pelo.

ESPECIE DEL HONGO	EXAMEN DIRECTO DE PREPARACION DE KOH	
	Raspados de piel	Pelo
<u>Trichophyton mentagrophytes.</u>	Micelio y cadenas de artroporas	Vainas o cadenas aisladas de esporas (3-5 u) en la superficie del pelo (ectotrix) Micelio dentro del pelo.
<u>Trichophyton gallinae</u>	Micelio y cadena de artroporas.	Las plumas no son afectadas

MICOSIS INICIALMENTE TEGUMENTARIAS

La Micosis Inicialmente Tegumentarias, son un grupo de infecciones que generalmente se presentan en forma localizada, involucran a la piel y al tejido subcutáneo, y raramente se pueden diseminar a órganos internos.

Para Medicina Veterinaria, se consideran de importancia clínica: La Rinosporidiosis, la Esporotricosis, la Maduromicosis (Mycetoma) y la Candidiosis.

Los agente etiológicos de estas enfermedades se encuentran como saprófitos en la naturaleza, y la vía general de infección ocurre por la contaminación de heridas por el hongo.

MICOSIS INICIALMENTE TEGUMENTARIAS

ENFERMEDAD	DESCRIPCION
Rinosporidiosis	<p>La Rinosporidiosis en los animales consiste en una rinitis-poliposa crónica producida por el <u>Rhinosporidium seeberi</u>. La lesión consiste en un polipo generalmente único y unilateral, pedunculado, adoptando en este caso un aspecto de coliflor. La enfermedad no es transmitible. Puede afectar en los equinos, bovinos y caninos, así como al hombre.</p>
Esporotricosis	<p>Es una infección micótica de la piel y linfáticos cutáneos provocada por el <u>Sporothrix schenckii</u>.</p> <p>La infección suele presentarse en las extremidades o el tronco, y toma una forma de nódulos subcutáneos o intradérmicos, de 1 a 4 cm. de diámetro. Los nódulos están formados por granulomas purulentos. Entre los animales la mayor parte de los casos descritos se refiere a los equinos.</p>

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<i>Sporothrix schenckii.</i>	<p>La fase parasitaria es una levadura Gram (+) descrita a veces como formas en puro de 2 a 10 micras de longitud demostrable en frotis de pus.</p>	<p>Como saprófito, el hongo toma una forma micelial - con hifas tabicadas de cerca de 2 micras de diámetro. En la extremidad de las ramificaciones se encuentran dispuestas en racimos, esporas ovales o piriformes que semejan a los pétalos de una flor.</p>
<i>Rhinosporidium seeberi,</i>	<p>El agente puede ser demostrado mediante cortes histológicos o por medio de preparaciones húmedas de los pólipos. Entre el estroma puede verse el agente en forma de esferulas de distintos tamaños.</p>	<p>No se ha logrado el cultivo en forma artificial.</p>
<i>Candida albicans.</i>		

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<p><u>Nocardia asterioides.</u></p>	<p>En los tejidos y exudados, el microorganismo aparece como filamentos delgados (0.5-1.0) ramificados y Gram (+). Es relativamente ácido-resistente y esta característica se demuestra mejor cuando se evita el empleo del alcohol en la tinción.</p>	<p>Las especies de Nocardia crecen bien en condiciones aerobias, sobre muchos medios de cultivo simples. Las colonias son cerasas con pigmentación que varía de amarilla a naranja o roja. Las hifas blancas aéreas se forman sobre la superficie de la colonia. La esporulación ocurre por fragmentación en artroporas.</p>
<p><u>Allescheria boydii</u></p>	<p>El examen microscópico revela una proliferación granulomatosa de la submucosa y mucosa basal, células de Langhans y clamidosporas de pared delgada con hifas segmentadas. En las muestras de pus y exudados pueden observarse colonias pigmentadas como puntos de color marrón o negro.</p>	<p>Produce un micelio aéreo blanco algodonoso. Al microscopio se observa un micelio septado moderadamente ancho. Conidias unicelulares, ovales o en forma de pera.</p>

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<u>Helminthosporium</u> sp.	Igual al exterior	<p>Crece formando una colonia de color gris, la cual presenta una área central deprimida de color negro. Al microscopio el micelio conidioforo y conidias son de color café oscuro. El conidioforo se desarrolla como una rama del micelio y se ensancha en la terminal y puede aparecer anudado o torcido. Las conidias tienen una semejanza notable con los huevecillos segmentados de los helmintos.</p>
<u>Curvularia geniculata</u>	Igual a <u>A. boydii</u>	<p>El micelio aéreo es blanco algodonoso que torna a gris, café y finalmente negro. Al microscopio se observan conidioforos fusiformes, abundantes de color café oscuro, tienen 3-4 tabiques y una tendencia a curvarse ligeramente.</p>

ESPECIE	EXAMEN DIRECTO DE PREPARACIONES DE KOH	
	Raspados de piel	Pelo
<i>Trichophyton rubrum.</i>	Micelio ramificado	La invasión del pelo es rara. En animales de experimentación se han observado cadenas de esporas fuera del pelo y micelio dentro de él.
<i>Trichophyton tonsurans.</i>	Micelio y cadenas de arthrosporas.	Los fragmentos de pelo, - presentan en su interior masas densas de color oscuro las cuales corresponden a esporas de gran tamaño (4-7.5) micras en cadena.
<i>Trichophyton verrucosum.</i>	Micelio y cadenas de arthrosporas.	Vainas o cadenas aisladas de grandes esporas (5-10) en la superficie del pelo (extrotix).
<i>Trichophyton equinum</i>	Micelio y cadenas de arthrosporas	Vainas o cadenas aisladas de esporas (3.5-8) en la superficie del pelo (extrotix) Micelio dentro del pelo.

ESPECIE DEL HONGO	EXAMEN DIRECTO DE PREPARACION DE KOH	
	Raspados de piel	Pelo
<u>Trichophyton mentagrophytes.</u>	Micelio y cadenas de artroporas	Vainas o cadenas aisladas de esporas (3-5 u) en la superficie del pelo (ectotrix) Micelio dentro del pelo.
<u>Trichophyton gallinae</u>	Micelio y cadena de artroporas.	Las plumas no son afectadas

MICOSIS INICIALMENTE TEGUMENTARIAS

La Micosis Inicialmente Tegumentarias, son un grupo de infecciones que generalmente se presentan en forma localizada, involucran a la piel y al tejido subcutáneo, y raramente se pueden diseminar a órganos internos.

Para Medicina Veterinaria, se consideran de importancia clínica : La Rinosporidiosis, la Esporotricosis, la Maduromicosis (Mycetoma) y la Candidiosis.

Los agente etiológicos de estas enfermedades se encuentran como saprófitos en la naturaleza, y la vía general de infección ocurre por la contaminación de heridas por el hongo.

MICOSIS INICIALMENTE TEGUMENTARIAS

ENFERMEDAD	DESCRIPCION
Rinosporidiosis	<p>La Rinosporidiosis en los animales consiste en una rinitis-poliposa crónica producida por el <u>Rhinosporidium seeberi</u>. La lesión consiste en un polipo generalmente único y unilateral, pedunculado, adoptando en este caso un aspecto de coliflor. La enfermedad no es transmisible. Puede afectar en los equinos, bovinos y caninos, así como al hombre.</p>
Esporotricosis	<p>Es una infección micótica de la piel y linfáticos cutáneos provocada por el <u>Sporothrix schenckii</u>.</p> <p>La infección suele presentarse en las extremidades o el tronco, y toma una forma de nódulos subcutáneos o intradérmicos, de 1 a 4 cm. de diámetro. Los nódulos están formados por granulomas purulentos. Entre los animales la mayor parte de los casos descritos se refiere a los equinos.</p>

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<i>Sporothrix schenckii.</i>	La fase parasitaria es una levadura Gram (+) descrita a veces como formas en puro de 2 a 10 micras de longitud demostrable en frotis de pus.	Como saprófito, el hongo toma una forma micelial - con hifas tabicadas de cerca de 2 micras de diámetro. En la extremidad de las ramificaciones se encuentran dispuestas en racimos, esporas ovales o piriformes que semejan a los pétalos de una flor.
<i>Rhinosporidium seeberi,</i>	El agente puede ser - demostrado mediante - cortes histológicos o - por medio de preparaciones húmedas de los pólipos. Entre el estroma puede verse el agente en forma de esférulas de distintos - tamaños.	No se ha logrado el cultivo en forma artificial.
<i>Candida albicans.</i>		

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<p><u>Nocardia asterioides.</u></p>	<p>En los tejidos y exudados, el microorganismo aparece como filamentos delgados (0.5-1.0) ramificados y Gram (+). Es relativamente ácido-resistente y esta característica se demuestra mejor cuando se evita el empleo del alcohol en la tinción.</p>	<p>Las especies de Nocardia crecen bien en condiciones aerobias, sobre muchos medios de cultivo simples. Las colonias son cerasas con pigmentación que varía de amarilla a naranja o rojiza. Las hifas blancas aéreas se forman sobre la superficie de la colonia. La esporulación ocurre por fragmentación en artroporas.</p>
<p><u>Allescheria boydii</u></p>	<p>El examen microscópico revela una proliferación granulomatosa de la submucosa y mucosa basal, células de Langhans y clamidosporas de pared delgada con hifas segmentadas. En las muestras de pus y exudados pueden observarse colonias pigmentadas como puntos de color marrón o negro.</p>	<p>Produce un micelio aéreo blanco algodonoso. Al microscopio se observa un micelio septado moderadamente ancho. Conidias unicelulares, ovales o en forma de pera.</p>

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<u>Helminthosporium sp.</u>	Igual al exterior	<p>Crece formando una colonia de color gris, la cual presenta una área central deprimida de color negro. Al microscopio el micelio conidioforo y conidias son de color café oscuro. El conidioforo se desarrolla como una rama del micelio y se ensancha en la terminal y puede aparecer anudado o torcido. Las conidias tienen una semejanza notable con los huevecillos segmentados de los helmintos.</p>
<u>Curvularia geniculata</u>	Igual a <u>A. boydii</u>	<p>El micelio aéreo es blanco algodonoso que torna a gris, café y finalmente negro. Al microscopio se observan conidioforos fusiformes, abundantes de color café oscuro, tienen 3-4 tabiques y una tendencia a curvarse ligeramente.</p>

IDENTIFICACION DE LAS MICOSIS SISTEMICAS

AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
Coccidioides	El hongo es dimórfico. En los tejidos su forma característica es una esférula o esporangio de 5 a 50 u de diámetro provisto de una doble pared gruesa.	En el crecimiento micelial, se observan hifas que en su parte terminal presentan artrosporas de paredes gruesas, las cuales son altamente contagiosas (infectantes.)
<u>Histoplasma capsulatum</u>	En los tejidos el parásito se localiza intracelularmente en las células del S.R.E. y las levaduras tienen de 2 a 4 micras de diámetro cuando se tiñen en H.E.	Produce un abundante micelio en cultivo. Este produce dos tipos de esporas, un microconidio pequeño, liso y globoso y un macroconidio o clamidospora grande de paredes gruesas.

MICOSIS SECUNDARIAMENTE TEGUMENTARIAS

ENFERMEDAD	DESCRIPCION
<i>Coccidioidomycosis</i>	<p>La coccidioidomycosis ocurre como una infección respiratoria primaria, provocada por el <u>Coccidioides immitis</u>. La mayor parte de las infecciones respiratorias son benignas y no progresivas. Cuando la infección llega a diseminarse forma lo que se conoce como "granuloma coccidial". En los animales se observa la forma generalizada en perros, caballos y ovejas. La enfermedad es muy común en los bovinos y los cerdos, limitada exclusivamente a las vísceras torácicas.</p>
<i>Histoplasmosis</i>	<p>Es una infección micótica que primariamente invade el sistema retículo endotelial del hombre y a los animales, provocada por el <u>Histoplasma capsulatum</u>. La enfermedad puede ser aguda, subaguda o crónica; localizada o generalizada. Las lesiones primarias suelen localizarse en las cavidades bucofaríngeas e intestinal. La infección generalizada resulta siempre progresiva y mortal. De los animales domésticos, el perro es el más afectado.</p>

ENFERMEDAD	DESCRIPCION
<p>Blastomicosis Norteamericana</p>	<p>Es una infección de presentación local o generalizada del hombre y los animales. <u>Blastomyces dermatitidis</u> un hongo dimórfico, es el responsable de la infección. El síndrome usual es el de una enfermedad crónica, con trastornos respiratorios terminales y muchos otros signos dependientes de la topografía de diseminación, se observa cojera de una o más extremidades. Las manifestaciones clínicas pueden ser exclusivamente cutáneas, afectando la piel, ojos, glándulas mamarias y ganglios linfáticos superficiales.</p>
<p>Criptococosis</p>	<p>Es una micosis subaguda o crónica, provocada por el <u>Cryptococcus neoformans</u>. La enfermedad puede ser local o generalizada, aunque demuestra una marcada predilección por el sistema nervioso central en el hombre, perro y otras especies. La infección puede ser cutánea, manifestándose en forma de nódulos ulcerativos. En la cavidad nasal las lesiones aparecen en forma de polipos mixomatosos.</p>
<p>Actinomicosis</p>	<p>Es una infección específica que afecta a la mayoría de los animales domésticos. La lesión clásica provocada por el <u>Actinomyces bovis</u> es la "quijada nodosa" de los bovinos, ésta y algunas otras lesiones se han estudiado en el hombre. En los cerdos el padecimiento afecta a la glándula mamaria provocando mastitis, en caballos el único tipo es el llamado "Mal de la Cruz", en perros y gatos la enfermedad presenta un curso más virulento y las lesiones recuerdan la infección provocada por <u>Nocardia</u>.</p>

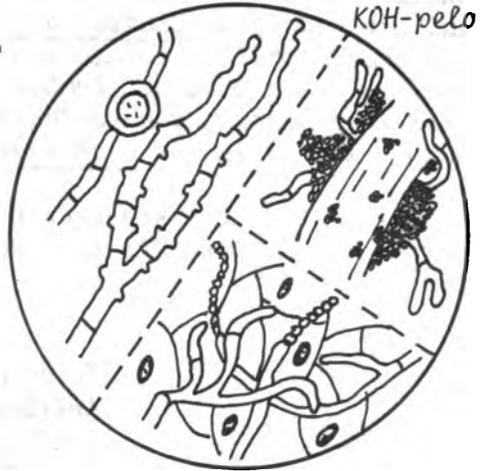
AGENTE	FORMA EN EL TEJIDO	FORMA EN EL CULTIVO
<u>Cryptococcus neoformans</u>	<p>El hongo es monofásico, en forma de levadura, rodeada por una amplia cápsula compuesta de mucopolisacáridos la cual puede evidenciarse en las muestras de L.C.R. = leche, orina y otros líquidos corporales extendidas en una gota de tinta china o nigrosina, observándose como un hilo grande transparente. En el tejido, el agente se demuestra mediante la tinción de P.A.S. Azul alcian y por la técnica de plata de Gomori, donde se observan levaduras de 5 a 20 micras de diámetro .</p>	<p>En cultivo, el agente forma colonias lisas-micocidas de color crema o café, cuando se incubaba de 20 a 37°C. Microscópicamente se pueden observar células en gemación, características con paredes gruesas. El hongo crece en la mayoría de los medios ordinarios de laboratorio.</p>
<u>Actinomyces bovis</u>	<p>El agente se puede demostrar en los frotis de los gránulos provenientes de pus, y de las estriadas de sangre y de los fragmentos de tejidos utilizando la tinción de Gram y el método de Kinyon en frío (empleando H₂SO₄ al 1% para la decoloración) El agente aparece como filamentos ramificados y pleomórficos de tamaño bacilar.</p>	<p>Las especies de <u>Actinomyces spp</u> son microaerófilas a anaerobias. Los medios pueden incubarse en cualquier sistema anaeróbico. <u>A. bovis</u> forma colonias en "gotas de rocío" - convexas. Las características morfológicas resaltan de la cantidad de filamento producido.</p>

ENFERMEDAD	DESCRIPCION
<p>Maduromicosis (Mycetoma)</p>	<p>El término Micetoma se aplica a las tumefacciones que ocurren por lo común en las extremidades. Los tumores son crónicos, la mayoría afectan la piel, tejido subcutáneo, fascia y huesos y pueden contener abscesos y múltiples fístulas que drenan. Las especies de animales que más frecuentemente se ven afectadas son el caballo, el perro, el gato y los bovinos. En los animales los agentes etiológicos involucrados son el género <u>Helminthosporium spp</u> <u>Allescheria boydii</u> <u>Curvularia geniculata</u> <u>Ascomycetos</u> y algunos <u>Deuteriomycetos</u></p>
<p>Nocardiosis</p>	<p>La Nocardiosis ocurre como un proceso granulomatoso supurativo crónico que puede verse localizado en la piel y tejido subcutáneo o generalizado a partir de un foco primario, generalmente pulmonar. La enfermedad es común en perros y gatos. La infección se ha diagnosticado en mandíbulas e quinas y en los cerdos. Existen numerosos reportes de mastitis bovina causada por <u>Nocardia asteroides</u>.</p>

Cultivo



Microsporium canis



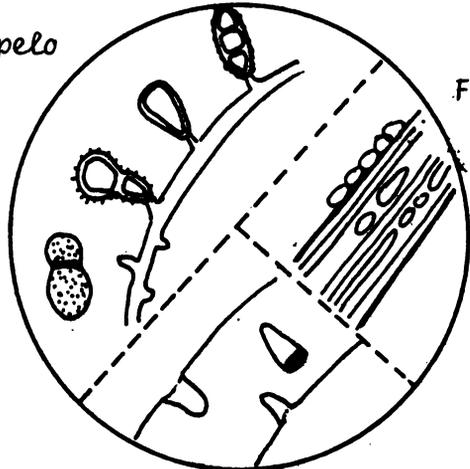
Microsporium audouinii

Cultivo



Microsporium gypseum

KOH-pelo



Microsporium nanum

KOH
piel

CANDIDOSIS

La Candidosis (Moniliasis) es causada por un hongo parecido a levadura, conocido como Candida spp. El hongo se encuentra frecuentemente como saprofito inerte alojado en el tracto digestivo, respiratorio y en la piel del hombre y de los animales domésticos, las especies involucradas y reportadas más frecuentemente en medicina humana y veterinaria son C. albicans y el C. tropicalis.

La presentación de la infección por este agente comprende una serie de factores predisponentes los cuales podemos agrupar de la siguiente forma:

Causas Iatrogénicas

Terapia con citostáticos
Antibioterapia prolongada
Corticoterapia
Radioterapia (sobre todo en humanos).

Factores

Físico-Químicos

pH
Humedad excesiva
Daño mecánico

Factores

Fisiológicos

Gestación
Parto (nacimientos prematuros)
Infancia
Obesidad

Factores

Patológicos

Diabetes mellitus
Cáncer
Discrasias sanguíneas
Deficiencias inmunológicas

La Candidosis aparentemente no tiene limitaciones geográficas, Candida spp está presente en el hombre y animales donde quiera que residan y sólo requieren la condición inductiva para hacerse manifiesta clínicamente. Los casos animales y en particular de las aves y los bovinos, son sin duda más frecuentes que los que indican las estadísticas.

DATOS CLINICOS

Debido a los diversos factores predisponentes y condiciones patológicas relacionadas, los signos clínicos de la Candidiasis en los animales domésticos no son específicos, los aspectos Veterinarios de esta enfermedad los podemos resumir de la siguiente manera:

En las aves (pollos, palomas, pavos y perdices) son muy frecuentes y bastante graves las lesiones parecidas al algodóncillo de los niños (crup) invaden la boca, el buche, el proventrículo, la molleja, y los intestinos, estas lesiones se caracterizan por la aparición de puntos o placas blanquecinas de forma circular o alargada sobre la parte superior de los pliegues de la mucosa descritas como parecidas a una toalla turca o a un coágulo. Los pollos afectados muestran: - crecimiento retardado adoptando el clásico síndrome del pollo achaparrado.

Especies de Candida (sobre todo albicans) han sido la causa de enfermedad generalizada en bovinos y se han aislado en casos de mastitis agudas, además de ha demostrado el agente de la ocurrencia de neumonías crónicas, exudados vaginales patológicos, abortos e inflamaciones específicas de esófago.

La candidiasis en el cerdo ha sido reportada con mayor frecuencia en los lechones, donde la infección oral cursa con una elevada mortalidad. Las lesiones en el tracto digestivo de los animales en engorde se caracterizan por la presentación de úlceras gástricas, y la afectación de la mucosa oral y esofágica también se ha observado la candidiasis cutánea en esta especie.

En el perro y en el gato, la Candidiasis se presenta como una dermatosis micótica, y está generalmente relacionada con procesos patológicos y con antibioterapia prolongada. Se han reportado infecciones genitales en el perro, provocando vaginitis y balanopostitis.

La Candidiasis equina es muy rara y aparentemente sólo ha sido descrita como una infección secundaria.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la Candidiasis requiere más que un aislamiento e identificación de las especies de Candida spp y un diagnóstico de esta enfermedad nunca debe aparecer en un informe de laboratorio, -

se reduce exclusivamente a identificar un patógeno potencial; la interpretación y el diagnóstico final deben ser reservados al clínico.

EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO

Los raspados de la piel y mucosas son examinados en preparaciones con KOH al 10%, los raspados de mucosa pueden ser extendidos en un portaobjetos y teñirse con Gram o preparaciones directas pueden trabajarse con Azul de Algodón de Lactofenol, el examen microscópico de estos frotis, puede mostrar la presencia de células redondas u ovals en gemación de 3 a 6 micras de diámetro (Blastosporas) y fragmentos de micelios (pseudomicelios) - o micelios verdaderos, en abundancia, si se observan estas tres estructuras características, es indicativo generalmente de la invasión de los tejidos por especies de Candida.

El examen directo de muestras provenientes de focos inflamatorios cerrados, líquidos corporales normalmente estériles (líquido pleural L.C.R. y sangre) o de orina recolectada en forma estéril que demuestre la presencia de Candida aún en número reducido es patológico.

IDENTIFICACION DEL GENERO CANDIDA

MATERIAL CLINICO

(Hisopos, Raspado Cutáneo y Mococutáneo, Sangre)

DEMOSTRACION

Examen en frasco (KOH)

Tinción de Gram

Tinción de P.A.S.

AI SLAM IENTO

Agar E.M.B.

Agar para *Dtaphylococcus* 110

Agar sangre

Agar Mycosel o S.D.A.

DETERMINACION DE ESPECIE

Prueba del Tubo Germinativo
Producción de Clamidosporas
Zimograma (Fermentación de azúcares)
Auxonograma (Aislación de azúcares)

CULTIVO (Aislamiento)

Se deben inocular medios selectivos para lograr el aislamiento de Candida spp ya que la mayoría de las muestras se obtienen de sitios normalmente habitados por bacterias, es recomendable inocular medios como el agar eosina azul de metileno el agar para Staphylococcus 110, agar chocolate, el agar sangre (incubado a 37°C . y a $27-28^{\circ}\text{C}$ por 48 a 72 horas) y el agar Micosel o agar dextrosa-Sabouraus (SDA) incubado a 37°C por 4 o 5 días.

En el agar S.D.A. las colonias jóvenes de Candida albicans son blancas, blandas y generalmente lisas; las colonias viejas presentan un crecimiento micelial sumergido en los márgenes dando la apariencia plumosa característica. El examen microscópico demuestra células ovales, redondas y en gemación. En los cultivos viejos pueden ser observados pseudomicelios y en ocasiones micelios verdaderos.

PRUEBA DEL TUBO GERMINATIVO

La prueba del tubo germinativo (Prueba de Filamentación) descrita por Taschdjian y Cols 1960, es un método rápido utilizado para la identificación de Candida albicans se basa en la producción de crecimientos periféricos por las células de C. albicans (pseudogermen) cuando se inoculan en 0.5ml. de suero humano o suero fetal bovino, y se incuban a 37°C por 3 horas, esta prueba ofrece grandes ventajas, es rápida, simple y muy específica y no requiere el empleo de cultivos puros.

La producción de tubos germinativos, distingue a Candida albicans de otras formas de levaduras. Una modificación empleando clara de huevo en lugar de suero, fue descrita por Buckley y Van Uden en 1963, otro método utiliza líquido amniótico bovino con la misma finalidad, la ventaja de este último, es que la filamentación ocurre en un lapso de 30 minutos.

PRODUCCION DE CLAMIDOSPORAS

La producción de Clamidosporas (conidios) por C.albicans constituye una prueba diferencial importante; éstas pueden ser producidas en el agar Harina de Maíz, o en el medio Gzapek Dox, suplementados con carne o con Tween 80 al 1%. El medio se inocula en ángulo de 45° con un alambre recto, parte del área inoculada deberá ser cubierta con un cubreobjetos estéril las cajas se incuban a 37°C por 24 horas y si un crecimiento no es característico se reincuban por 2 a 3 días más.

Deben evitarse los errores de interpretación debidos a la rara producción de Clamidosporas similares aunque morfológicamente diferentes de otras especies de Candida especialmente C.guilliermondi y C.stellatoides.

ZIMOGRAMA Y AUXONOGRAMA

A causa de la simplicidad y especificidad de la prueba del suero en tubo y de la producción de Clamidosporas, Candida albicans puede ser rápidamente identificada con certeza mediante una combinación de las dos pruebas, la confirmación puede ser obtenida mediante las pruebas de Fermentación y Asimilación de azúcares.

ASPERGILOSIS

La Aspergilosis ampliamente difundida, comprende un grupo de micosis con causas diversas y patogénesis distinta, los hongos del género Aspergillus son ubicuos y de las numerosas especies que se conocen, una de ellas el Aspergillus fumigatus produce la mayor parte de infecciones en mamíferos, aves y hombre, aunque hay otras especies como el A.flavus el A.niger y el A.nidulans que pueden actuar también como patógenos ocasionales.

La enfermedad es relativamente rara en los animales domésticos y en los animales de compañía, pero ocurre con frecuencia en las aves y bovinos. La Aspergilosis demostrada por la detección de los organismos en las lesiones, es considerada como una infección respiratoria primaria, iniciada por la inhalación de esporas o bien como una infección placentaria, en la cual se encuentra involucrado el feto y el útero gestante.

Los Aspergillus están presentes como saprófitos en la mayoría de los climas, y las principales fuentes de contaminación las constituyen los alimentos y camas emmohecidos, especialmente el heno y los granos que, por una excesiva humedad favorecen la proliferación del hongo, estos hongos producen sustancias venenosas denominadas Micotoxinas principalmente A. flavus y A. fumigatus estas sustancias son altamente tóxicas (al igual que carcinogénicas) - para los animales y el hombre .

Ocasionalmente puede ocurrir metástasis de la infección hacia - otros tejidos (entre los que se cuentan las meninges) y el riñón, el cual es uno de los más afectados.

DATOS CLINICOS

Los signos clínicos que han sido descritos en las aves y en los - bovinos, comprenden:

En las aves, la Aspergelosis se presenta (en la mayoría de las oca - siones) en forma epizootica en cuyo caso las pérdidas económicas - son considerables a diferencia de la mayoría de los otros hongos - productores de micosis profundas, éste ataca con mayor frecuencia - a las aves jóvenes que a las adultas; en la forma aguda (neumonía - de criadora) la infección cursa con problemas respiratorios marca - dos, en algunos casos el hongo invade el cerebro y causa parálisis y otros signos de afección del SNC, las afecciones oculares son - comunes.

En los ovinos se ha observado varias formas de Aspergilios; para - Medicina Veterinaria es importante hacer mención al denominado "A - borto Micótico" bovino provocado por la invasión oportunista de - los géneros Aspergillus, Absidia, Mucor y Rhizopus con la excep - ción de los Rhizopus estos microorganismos son patógenos secunda - rios bien conocidos. El aborto se presenta en la gestación avanza - da, entre el sexto y el octavo mes; el feto abortado rara vez está vivo, y la retención placentaria ocurre en aproximadamente un 60% - de los casos, el feto puede aparecer normal pero con frecuencia - muestra lesiones cutáneas características en forma de placas eleva - das irregulares semejantes a la ictiosis o a la tiña difusa.

Son raros los casos auténticos de Aspergelosis en las demás espe - cies domésticas; existen reportes de que la ingestión de alimentos emmohecidos sobre todo si están contaminados por A. fumigatus y - A. flavus, pueden producir una enfermedad mortal en los cerdos y ga - nado vacuno que se manifiesta por hemorragias internas.

Se ha reportado la Argeliosis pulmonar fatal en gatos. Los aislamientos del agente en perros, se han realizado de infecciones nasales y en infecciones mixtas de la oreja.

Las lesiones producidas por las Micotoxinas (aflatoxinas) son muy variadas, graves y en muchas ocasiones mortales, estas lesiones, son las mismas que se observan en el llamado "Síndrome Hemorrágico" y se caracterizan por la presencia de fragilidad capilar y hemorragias generalizadas; la hepatotoxicosis es común en presencia de aflatoxinas; la Citrinina, presenta un marcado efecto nefrotóxico y la Zearalenona está involucrada con la ocurrencia de abortos.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la Aspergelosis requiere de un cuidadoso enfoque los Asperillus constituyen los hongos contaminantes más comunes en el laboratorio y rutinariamente pueden ser cultivados de la piel y del tracto respiratorio superior de los animales sanos; es evidencia presuntiva de Aspergelosis el aislamiento repetido de una especie de Aspergillus del material clínico en ausencia de otros agentes patógenos.

EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO

Las preparaciones húmedas pueden examinarse directamente. El material clínico (raspados) se obtiene con facilidad de las vías aéreas durante la necropsia de las aves afectadas. Los raspados cutáneos del feto, y las muestras de líquido abomasal, los mismos que las muestras de placenta, pueden ser teñidos por el método de Gram, o bien, puede emplearse Azul de Algodón de Lactofenol. El examen microscópico demuestra un micelio de 4 a 6 micras de ancho, es tabicado y de un diámetro regularmente uniforme, aunque no es posible (a menos que una cabeza conidial este presente) distinguir este micelio de otros micelios hialinos, la presencia de grandes cantidades del mismo es sugestiva de Aspergilosis.

CULTIVO (Aislamiento)

El Aspergillus fumigatus y el Aspergillus flavus, así como otras especies de Aspergillus crecen bien en el agar dextrosa Sabouraud los antibióticos antibacterianos pueden ser utilizados en el medio, pero no deberá emplearse la cicloheximida ya que la mayor parte de los Aspergillus son sensibles a este antibiótico.

Las colonias de Aspergillus fumigatus son planas, al principio son blancas y ligeramente bellotas, posteriormente las conidias toman color verde azulado oscuro y un aspecto pulverulento. Los cultivos viejos tienen una apariencia gris "ahumada" la cual es muy característica.

El examen microscópico muestra una vesícula de forma parecida a la de un matraz invertido con un fondo redondeado y un cuello alargado. Una fila esterigmata está situada en la mitad superior de la vesícula, en una formación más o menos paralela (aglomerada) las conidias, son esféricas, verdes y de superficie rugosa, las cadenas de las conidias que se desprenden de la esterigmata son más o menos paralelas, esto da una apariencia columnar o de bandera a las cabezas.

Las colonias de Aspergillus flavus crecen y se extienden rápidamente en los medios ordinarios, el color de las áreas conidiales varía del verde amarillento claro al oscuro, la coloración verde puede desaparecer en los cultivos viejos resultando una apariencia de la superficie de color amarillo o café amarillento.

El examen microscópico pueden observarse conidióforos de 400 a 1000 micras de por 5 a 10 micras de diámetro, las paredes del conidióforo pueden estar excavadas rugosas y en ocasiones espinosas en apariencia.

La esterigmata está dispuesta ya sea en una serie simple o en series simples o dobles en la misma vesícula, las conidias son de 3 a 5 micras de diámetro, piriformes o redondas, excavadas y equinuladas, pueden variar de casi incoloras a verde amarillentas.

B I B L I O G R A F I A

1. Ajello, L.; Georg, K.L.; Kaplan, W.; Kaufman, L. (1975). Laboratory Manual for Medical Mycology. U.S. Department of Health, Education, and Welfare Public Health Service.
2. Alba, F.J.; Garsa, G. D.; Martínez, C. E.; Osorio, F. M.; Ruiz, R. A.; Sandoval, C. Ma. A.; Tovar, T. C.; Trujillo, G. A. (1982). Manual de Micología Médica. 3a. edición. I.P.N. Departamento de Micología. México.
3. Alexopoulos, C. J. (1966). Introducción a la Micología. 1a. edición. E.U.D.E.B.A. Argentina.
4. Barnett, H. L. (1972). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota, U.S.A.
5. Bauer, J. D.; Ackerman, G.P. (1974). Clinical Laboratory Methods. Eighth Edition. The C.U. Mosby Company. U.S.A.
6. Benke, E. S.; Rogers, A.L. (1970). Medical Mycology Manual. Third Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. U.S.A.
7. Bennington, F. H. (1976). El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. 1a. ed. La Prensa Médica Mexicana. México.
8. Bionon de México, S. A. de C. V. (1984). Medios de Cultivo y Reactivos de Diagnóstico. Editado por Bionon de México. México.
9. Boyd, R.; Marr, J. (1980). Medical Microbiology. First Edition. Little, Brown and Company. U.S.A.
10. Bradshaw, L. J. (1976). Microbiología de Laboratorio. 1a. edición. El Manual Moderno. México.
11. Branson, D. (1972). Methods in Clinical Bacteriology: A Manual of Test and Procedures. Publication Number 840. Charles C. Thomas Publisher. U.S.A.
12. Bryant, M. C. (1976). Antibióticos y su Control mediante el Laboratorio. 1a. edición. El Manual Moderno. México.

13. Buttiaux, R.; Seerens, N.; Tacquet, A. (1969). Manual de Techniques Bacteriologiques. Third Edition. Editions Medicales Flammarion.
14. Campbell, C. M.; Stewart, J. L. (1980). The Medical Mycology Handbook. A Wiley Medical Publication. John Wiley and Sons. New York. U.S.A.
15. Carpenter, L.P. (1979). Microbiología. 4a. edición. Ed. Interamericana. México.
16. Carter, G. R. (1969). Procedimientos de Diagnóstico en Bacteriología y Micología Veterinarias. 1a. edición. Edit. Acribia. España.
17. Coffin, L. D. (1977). Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria. 2a. reimpresión. La Prensa Médica Mexicana. México.
18. Cowan, S. T.; Steel, K. J. (1979). Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. 1a. edición. Compañía Editorial Continental, S. A. México.
19. Davidsohn, I.; Bernard, J. (1983). Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6a. edición. Salvat Editores.
20. Deacon, J. W. (1980). Introduction to Modern Mycology. Basic Microbiology. Volume 7. First Published. Blackwell Scientific Publications. London and Edimburg.
21. Dirección General de Información y Relaciones Públicas de la S.A.R.H. y la Dirección General de R.T.C. de la Secretaría de Gobernación. (1984). Envío de Muestras a Laboratorios Veterinarios. Editorial Talleres Gráficos de la Nación (Texto). México.
22. Dirección General de Investigación en Salud Pública. (1979). Comité Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos. Laboratorio Nacional de Salubridad. México.
23. Dirección General de Sanidad Animal. Subdirección de Epizootiología. Departamento de Diagnóstico S. A. R. H. (1980). Rcolección y Envío de Muestras al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario. Dr. Mora No. 15-7o. piso. México, D. F.

24. Emmons, Ch. W.; Binford, Ch. H.; Uts, J. P. (1970). Medical Mycology. Second Edition. Lea an Febiger. Philadelphia, U. S. A.
25. Funder, S. (1968). Practical Mycology: Manual for Identification of Fungi. Third Revised Edition. Hafner Publishing Company, Inc. New York an Kingston - Upon - Thames. U. S. A.
26. Gaviño de la Torre, G.; Juárez, L. C.; Figueroa, T. H. H.; (1977). Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo. 3a. reimpression. Editorial Limusa. México.
27. Gow, N.A.R.; Gooday, W.; (1984). A Model for the Germ Tube Formation and Mycelial Growth Form of Candida albicans. Saborsaudia. J. Med. Vet. Micrology. Vol. 22 2: 137 - 143.
28. Hagan, W. A.; Bruner, D. W., (1970). Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. 3a. edición. La Prensa Mexicana. México.
29. Hajas, J.; Hámori, D.; (1972). El Cuidado de los Animales Domésticos. Colección Málaga, S. A., México.
30. Haren, E.; Gordon, M.; (1970). Laboratory Indentification of Pathogenic Fungi Simplified. Third Edition. American Lecture Series.
31. I. M. S. S. Dirección General. (1978). Laboratorio Clínico: Procedimientos. 3a. edición. México.
32. Jang, S.; Biberstain, E.; Barajas, R.J.A.; (1974). Diagnóstico Microbiológico. Departamento de Bacteriología y Micología. F.M.V.Z. U.N.A.M. México.
33. Jarvis, J. D.; (1976). Bacteriología Clínica Básica. 1a. edición. Editorial El Manual Moderno. México.
34. Jawetz, E.; Melnick, E. A.; (1983). Manual de Microbiología Médica. 9a. edición. Editorial, El Manual Moderno. México.
35. Jub, K. V. F.; Kennedy, P. C.; (1973). Patología de los Animales Domésticos. 1a. edición española. (tomo 1). Editorial Labor, Barcelona, España.

36. Jungerman, F. P.; Schwartzman, M. R.; (1977). Micología Médica Veterinaria. 1a. edición. Compañía Editorial Continental, S. A., México.
37. Keilbach, B. N. M.; (1983). Guía para la Realización de Necropsias y el Diagnóstico de Algunas Enfermedades de los Animales Domésticos. Tesis Profesional. F.E.S./Cuatitlán/UNAM. México.
38. Kelly, W. R.; (1981). Diagnóstico Clínico Veterinario. 4a. impresión. Compañía Editorial Continental, S. A., México.
39. Kourary, M.; (1976). Obtención y Manejo de Muestras para Exámenes Microbiológicos de las Enfermedades Transmisibles. 1a. edición. Organización Panamericana de la Salud. O.M.S. México.
40. López-Alvarez, J.; Barajas, R.J.A.; (1982). Manual de Laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinarias. Departamento de Bacteriología. F.M.V.Z./UNAM. México.
41. Mac Faddin, J. F.; (1979). Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. The Williams and Wilkins. Company Reprinted. Baltimore, U.S.A.
42. Martín-Pascual, A.; Vázquez, R.; (1979). Dermatofitos (Aspectos Clínicos y Morfología Ultraestructural) Atlas. 1a. edición. Ediciones Universidad de Salamanca. España.
43. Merck - México, S. A. (1983). Medios de Cultivo Merck; Criterios de Calidad. División Química. México.
44. Neugebauer, J.; (1983). Atlas de Enfermedades Infecciosas. 1a. edición. Ediciones (Roche), Basilea.
45. Odds, F. C.; (1979). Candida and Candidosis. First Edition. University Park Press. Baltimore, U.S.A.
46. Oswaldiston, G. W.; (1983). Técnicas de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1a. edición. Editorial Acribia. España.
47. Pijoan, A. C.; Ciprian, C. A.; Lastra, G. A.; (1978). Manual de Identificación de Bacterias de Interés Veterinario. 2a. edición. Talleres Gráficos de Guadarrama Impresores, S. A., México.

48. Rebel, G.; Taplin, D.; (1974). Dermatophytes, Their Recognition and Identification. Second Edition. University of Miami Press, U.S.A.
49. Rodríguez, M. G.; González, R.; Mariño, L.; (1978). Manual de Técnicas en Microbiología. Instituto Colombiano Agropecuario. División de Ciencias Veterinarias. Bogotá D. E. Colombia.
50. Segretain, G.; Drouhet, E.; Mariat, F.; (1977). Diagnóstico de Laboratorio en Micología Médica. 1a. reimpresión. La Prensa Médica Mexicana. México.
51. Smith, A. L.; (1977). Microbiology Laboratory Manual and Workbook. Fourth Edition. The C.U. Mosby Company. Saint Louis Missouri, U.S.A.
52. Smith, T. D.; Conant, F. N.; (1960). Bacteriología de Zinsser. 2a. edición. U.T.E.N.A. U.S.A.
53. Thienpont, D.; Rochette, F.; Vamparijs, D. S. J.; (1979). Diagnóstico de Helminthiasis por medio de Examen Coprológico. Chinoín, División Veterinaria. España.
54. Van, Demark, J.P.; Seeley, W. H.; (1973). Microbios en Acción; Manual de Laboratorio para Microbiología. 1a. edición en español. Editorial Blume. México.
55. Willis, A. T.; (1977). Anaerobic Bacteriology; Clinical and Laboratory Practice. Third Edition. Butterworths (Publishers) Inc. London- Boston.
56. Wistreich, A. G.; Lechtman, D. M.; (1978). Prácticas de Laboratorio en Microbiología. 2a. edición. Editorial Limusa. México.
57. Zapater, C. R.; (1970). Introducción a la Micología Médica. 2a. edición. Editorial "El Ateneo". Argentina.
58. Zemjanis, R.; (1981). Reproducción Animal; Diagnóstico y Técnicas Terapéuticas. 6a. reimpresión. Editorial Limusa. México.

48. Rebel, C.; Taplin, D.; (1974). Dermatophytes, Their Recognition and Identification. Second Edition. University of Miami Press, U.S.A.
49. Rodríguez, M. G.; González, R.; Mariño, L.; (1978). Manual de Técnicas en Microbiología. Instituto Colombiano Agropecuario. División de Ciencias Veterinarias. Bogotá D. E. Colombia.
50. Segretain, G.; Drouhet, E.; Mariat, F.; (1977). Diagnóstico de Laboratorio en Microbiología Médica. 1a. reimpression. La Prensa Médica Mexicana. México.
51. Smith, A. L.; (1977). Microbiology Laboratory Manual and Workbook. Fourth Edition. The C.U. Mosby Company. Saint Louis Missouri, U.S.A.
52. Smith, T. D.; Conant, F. N.; (1960). Bacteriología de Zinsser. 2a. edición. U.T.E.H.A. U.S.A.
53. Thianpont, D.; Rochette, F.; Vamparijs, D. S. J.; (1979). Diagnóstico de Helminthiasis por medio de Examen Coprológico. Chinoin, División Veterinaria. España.
54. Van, Demark, J.P.; Seeley, W. M.; (1973). Microbios en Acción; Manual de Laboratorio para Microbiología. 1a. edición en español. Editorial Blume. México.
55. Willis, A. T.; (1977). Anaerobic Bacteriology; Clinical and Laboratory Practice. Third Edition. Butterworths (Publishers) Inc. London- Boston.
56. Wistreich, A. G.; Lechtman, D. M.; (1978). Prácticas de Laboratorio en Microbiología. 2a. edición. Editorial Limusa. México.
57. Zapater, C. R.; (1970). Introducción a la Micología Médica. 2a. edición. Editorial "El Ateneo". Argentina.
58. Zemjanis, R.; (1981). Reproducción Animal; Diagnóstico y Técnicas Terapéuticas. 6a. reimpression. Editorial Limusa. México.

