



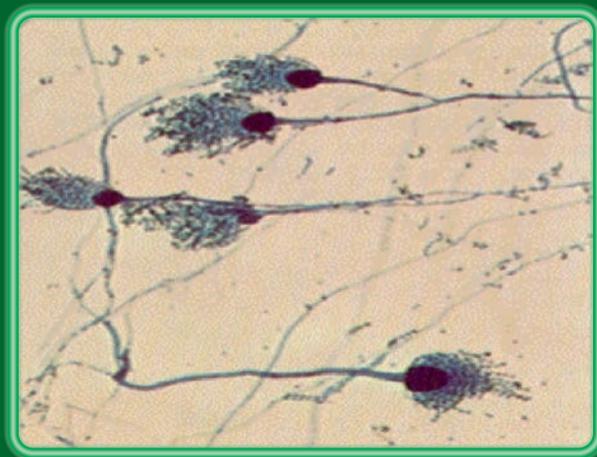
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

Facultad de Ciencia Animal

Departamento de Medicina Veterinaria

**“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”**

**PRÁCTICA DE LABORATORIO
MICROBIOLOGIA VETERINARIA II**



Autor:

- Ing. Radamés L. García A. MSc.

Profesor de Microbiología e Inmunología

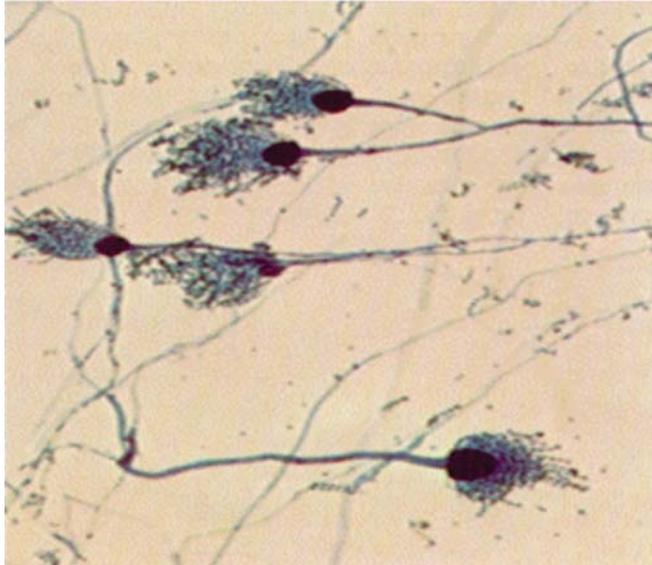
Universidad Nacional Agraria de la Habana, Cuba



“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL
Departamento de Veterinaria

Práctica de Laboratorio



Microbiología Veterinaria II

Autor:
- Ing. Radamés L. García A. MSc.
Profesor de Microbiología e Inmunología
Universidad Nacional Agraria de la Habana, Cuba

Managua, Nicaragua
2013

N
576

G216 García A., Radamés L.
Práctica de laboratorio. Microbiología
veterinaria II / Radamés L. García A. --
1a ed. -- Managua : UNA, 2013
67 p. : il., col.

ISBN 978-99924-1-026-4

1.LABORATORIOS DE MICROBIOLOGIA
2.DIAGNOSTICO DE LABORATORIO-
ENSEÑANZA 3.MEDICINA VETERINARIA

* Todos los derechos reservados
2013

© Universidad Nacional Agraria
Centro Nacional de Información y Documentación Agropecuaria
Km. 12½ Carretera Norte, Managua, Nicaragua
Teléfonos: 2233-1501. 2233-1899, 2233-1871
Fax: 22331619

Ing. Radamés L. García A. MSc.
Profesor de Microbiología e Inmunología

La UNA propicia la amplia diseminación de sus publicaciones impresas y electrónicas para que el público y la sociedad en general obtenga el máximo beneficio. Por tanto en la mayoría de los casos, los colegas que trabajan en docencia, investigación y desarrollo no deben sentirse limitados en el uso de los materiales de la UNA para fines académicos y no comerciales. Sin embargo, la UNA prohíbe la modificación parcial o total de este material y espera recibir los créditos merecidos por ellos.

Prólogo

El Manual de Prácticas de Laboratorio tiene como objetivo principal que los estudiantes tengan de forma directa los contenidos prácticos y de procedimiento para el diagnóstico de las enfermedades más frecuentes en las especies en explotación.

Se reúne la información básica y necesarios a adquirir; el algoritmo para alcanzar la compleja tarea del aislamiento e identificación de los agentes etiológicos causantes de las enfermedades mediante el empleo de métodos y técnicas que son el resultado de las experiencias de personas que dedicaron toda su vida a la preservación de la salud pública y veterinaria.

Como proceso instructivo es de interés que los estudiantes adquieran un método de estudio y de organización en el proceso de aprendizaje.

Es propósito redactar mejor y además se adquieran hábitos y habilidades con una actividad independiente en una interrelación constante con la teoría.

Es muy importante tener un sentido amplio, generalizador, de constante búsqueda de soluciones, así también propiciar un pensamiento de carácter experimental y científico de forma activa hacia la comprobación en la práctica diaria todo lo aprendido.

Los conocimientos adquiridos han de propiciar el interés por profundizar y conocer más hacia la búsqueda de soluciones por lo cual, ha de tener en cuenta el trabajo bibliográfico y el vínculo necesario con otras disciplinas de la especialidad.

El autor y todos los que me precedieron y aportaron les damos los instrumentos para que se preparen como profesionales capaces de cumplir con sus futuras responsabilidades y compromisos sociales.

Ing. Radamés L. García A. MSc.
Prof. Microbiología e Inmunología
Facultad de Medicina Veterinaria
Universidad Agraria de La Habana UNAH Cuba

Ing. Radamés L. García

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Obtención y conservación de muestras patológicas para el diagnóstico e identificación del agente etiológico	3
2. Diagnóstico del género <i>Aspergillus</i>	8
3. Diagnóstico de los géneros <i>Trichophyton</i> y <i>Microporum</i>	11
4. Diagnóstico del género <i>Candida</i>	17
5. Diagnóstico del género <i>Mycobacterium</i>	21
6. Diagnóstico del género <i>Leptospira</i>	30
7. Diagnóstico del género <i>Erysipelothrix</i>	42
8. Diagnóstico del género <i>Clostridium</i>	48
9. Diagnóstico del género <i>Streptococcus</i>	54
10. Diagnóstico del género <i>Staphylococcus</i>	58
11. Diagnóstico del género <i>Escherichia</i>	65
12. Diagnóstico del género <i>Salmonella</i>	71
13. Diagnóstico del género <i>Brucella</i>	76
14. Diagnóstico del género <i>Pasteurella</i>	84
15. Diagnóstico de género <i>Mycoplasma</i>	89
16. Diagnóstico del género <i>Rickettsia</i>	95
BIBLIOGRAFIA	100

Práctica de Laboratorio No. 1.

Título: Obtención y conservación de muestras patológicas para el diagnóstico e identificación del agente etiológico.

Objetivo:

- Aprender como tomar las muestras de las lesiones.
- Conocer las medidas de conservación para el envío al laboratorio.

Introducción:

La toma correcta de las muestras constituye una de las tareas más importantes para la identificación del agente causal y el conocimiento de la enfermedad.

Como el asilamiento es una tarea muy difícil se requiere antes y después de la muerte obtener tejidos fresco, teniendo en cuenta la segura invasión de microorganismos intestinales, algunos patógenos potenciales, que pueden interferir los resultados y procedimiento en el diagnóstico.

Debe seleccionarse el sitio adecuado para el muestreo donde el agente infeccioso este en el estado más representativo de la enfermedad y además propiciar la supervivencia y crecimiento del mismo.

Si la muestra es obtenida de lugares del cuerpo como por ejemplo: sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), cavidad pleural etc..., la identificación es menos complicada, pero si la muestra se toma de lugares donde existe un microflora normal pueden venir acompañados de otros microorganismos, algunos quizás vinculados a la patología y sus lesiones.

Requisitos generales para la tomas de muestras;

- * Obtener la cantidad suficiente y del lugar adecuado.
- * Debe ser representativa de la infección y de la enfermedad en curso.
- * Emplear material estéril y evitar al máximo las contaminaciones.
- * Tener preparada las condiciones para su traslado al laboratorio en breve tiempo.
- * No haber consumido sustancias antimicrobianas antes de tomarla.
- * En caso de muertes tomar las muestras de inmediato.
- * Si la enfermedad está en curso, enviar animales enfermos en los diferentes estadíos.
- * Acompañar los datos generales e identificación del animal.
- * Entregar la historia clínica, incorporando la situación epizootiológica, el cuadro clínico, lesiones de la necropsias y un diagnóstico presuntivo.

Causas del deterioro de la muestra.

1.- Hemólisis: puede ser por diversas causas, entre estas se encuentran; haber realizado una agitación indebida, el efecto de un calentamiento o enfriamiento, descomposición por acción bacteriana, presencia de contaminantes químicos, etc.

2.- Descomposición microbiana; puede ser por contaminación de origen fecal, suelo, polvo y residuos orgánicos, también se deba temperaturas elevadas que favorecen el desarrollo microbiano unido además a viajes muy distantes.

Conservación de las muestras

1.- Refrigeración: constituye el conservante más efectivo y se emplea para fragmentos pequeños, empleando hielo natural, cuando es mucha distancia se utiliza hielo seco, Las muestras se introducen en bolsas de nylon nuevas, bien cerradas y se guardan en envases de doble pared.

2.- Preservantes: se utilizan en muestras de sueros sanguíneos para las reacciones serológicas, se emplean fenol al 5% ó de mertiolate ó timerosal a 1/10000, en proporción de 1 a 9 partes del suero sanguíneo.

3.- Bacteriostáticos: Se emplean cuando las bacterias deben mantenerse sin desarrollarse, evitando contaminen las muestras; se emplea glicerina tamponada neutra al 50%, en muestras para diagnóstico viral.

Procedimiento para tomar las muestras:

Exudado rectal: Previa desinfección con alcohol al 70% en la región perineal, se introduce el hisopo y se guarda la muestra en tubo bacteriológico, se conserva a 4 grados para su envío al laboratorio.

Exudado nasal y ótico: Se realiza la desinfección nasal. Se introduce un hisopo en cada orificio nasal, mantener en refrigeración y enviar al laboratorio. En las muestras de otitis se procede de igual forma especificando el lugar cada muestra.

Exudado uterino y vaginal: Se realiza primero un lavado con agua y jabón, después se desinfecta con alcohol al 70% sobre la vulva y los labios vulvares, en animales mayores se introduce el espéculo.

Para el exudado uterino, se introduce una varilla con algodón en la punta hasta el segundo anillo del cuello del útero (cérvix), evitando rozar las paredes de la vagina.

Para el exudado vaginal, el hisopo tomara muestra de las paredes en la región anterior, evitando la parte posterior y ventral donde puede contaminarse.

Conservar a 4 grados y enviar al laboratorio.

Muestras de leche: Deben tomarse antes del ordeño, eliminando los primeros chorros, después desinfectar los pezones con una torunda para cada pezón con alcohol al 70%. Las muestras se toman en sentido inverso al recorrido de la desinfección, extrayendo 15 ml de cada pezón y situar en respectivos tubos, cada frasco se rotula y se envía conservado a 4 grados.

Muestras de una dermatomycosis: Se realiza la desinfección, si hay escamas se toman las situadas en los bordes aunque estén inflamados, los pelos lesionados se desprenden, cuando no esta definidas las lesiones se hace un raspado y se envía al laboratorio.

Muestras de vísceras: (bazo, hígado. ganglios linfáticos, pulmones etc...), el tamaño de las muestras debe ser superior a 3 cm. incluyendo las partes lesionadas.

Si son muestras de sangre, se toman del corazón

Si son exudados de toman de la cavidad pleural, abdominal, pericárdica, de las articulaciones y (LCR) líquido céfaloraquídeo.

Las asas intestinales se envían con lo extremos cerrados.

Todas las muestras se mantienen en refrigeración en hielo seco.

Muestras para examen en inmunología: Utilizando jeringa estéril las muestras se toman de sangre sin anticoagulante, líquido cerebro espinal.

Se conservan en refrigeración y se le añade fenol al 0.5 % y mertiolato a 1/10000 para evitar la contaminación bacteriana.

Muestras para examen de virología: Necesario conocer los tejidos invadidos por los virus y en su obtención se debe evitar la contaminación bacteriana, las muestras se envían en congelación con hielo seco y añadir a los frascos de 5-10 volúmenes de glicerina tamponada estéril.

En caso de muestras de sangre, suero y LCR se envía en refrigeración.

Práctica de Laboratorio No. 2

Título: Diagnóstico del género *Aspergillus*

Objetivo:

1. Conocer y hacer el procedimiento para identificar el agente etiológico.
2. Seleccionar y obtener las muestras de acuerdo a las lesiones y especie afectada.
3. Observar las características macroscópicas y microscópicas

Agente causal: *Aspergillus fumigatus*

Introducción: Los *Aspergillus* son hongos saprófitos comunes distribuidos en el heno, alimentos, pienso, sustratos en descomposición cuando están favorecidos por la humedad y la temperatura. Su reproducción sexual es mediante estructuras llamadas ascas, las cuales contienen ascosporas y reproducción asexual es por hifas fértiles que diseminan gran cantidad de esporas o conidias.

Estas esporas o conidias se esparcen como aerosoles que son inhaladas y al penetrar por vía respiratoria ocasionan la enfermedad.

Especies susceptibles: Aves, bovinos, equinos, personas

Lesiones:

Aves: Forman nódulos caseosos amarillos en el pulmón pasando a otros órganos ocasionando una aerosaculitis difusa (sacos aéreos), neumonitis difusa y neumonitis nodular.

Causan: Anorexia, diarrea y fiebre.

Bovino: Produce aborto micótico. Las esporas después de penetrar por vías respiratorias pasan a sangre hasta el útero causando una metritis micótica, de aquí pasan a la placenta causando una placentitis, produciendo una hiperqueratosis que ocasiona el aborto micótico aspergilar.

En las personas produce lesiones e infecciones en pulmones, senos nasales, oídos externos, bronquios, huesos y meninges.

Muestras: En animales mayores se recoge y envían fragmentos de pulmones de la lesión.

En aves se envían aves muertas y enfermas, acompañado de muestras de pienso, camas, excretas, etc.

Si hay un aborto micótico se envían porciones de la placenta, feto y su contenido gástrico.

Materiales:

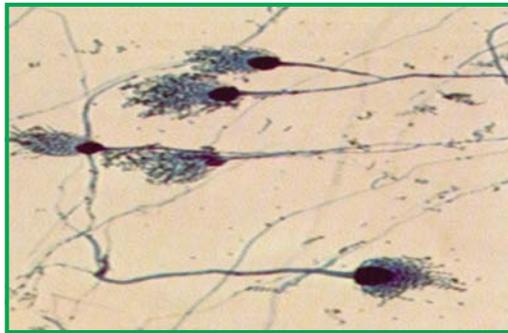
- Porta y cubre objetos
- Agua destilada con NaOH al 10% o con lactofenol
- Asas y agujas bacteriológicas
- Mechero Bunsen
- Espátula
- Pinzas
- Tijeras
- Microscopio compuesto de campo claro
- Agar Sabraud con estreptopenicilina y sin actidione
- Placas de Petri
- Microscopio estéreo
- Alcohol al 90%

Diagnóstico

Se examina las muestras de tejido sean de los pulmones, sacos aéreos, placenta o de las raspados de la piel y mucosas añadiendo al portaobjeto una gota de NaOH al 10%.

Después se procede a disgregar con el escalpelo y la aguja de platino hasta quedar lo más separado posible. Poner cubre objeto en movimiento de bisagra para eliminar cámaras de aire. Poner en la platina del microscopio y observar con objetivo 10x y después 40x (objetivos secos)

Se observan: hifas fértiles con cabeza conidiales y hacia el exterior cadena de conidios o esporas, a veces con un esterigma con coloración verdosa.



Cultivo para aislamiento:

Agar Saboraud con estreptomycin y sin actidione, también se emplea el agar Czapek a pH 5.5 temperatura 25 a 30°C.

Características macroscópicas:

Crece a los 3-5 días dando colonias blancas, después verde-azules y por último grises. Del cultivo aislado se repite la observación microscópica y debe presentar las mismas estructuras vistas en los tejidos y nódulos.

Diagnóstico confirmativo: Deben coincidir con las estructuras del género *Aspergillus*.

Práctica de Laboratorio No. 3

Título: Diagnóstico de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum*

Enfermedad o lesiones: Dermatomicosis

Objetivo:

- a. Identificar las lesiones y daños que ocasionan los dermatofitos
- b. Seleccionar y enviar las muestras correctamente
- c. Realizar el diagnóstico del agente etiológico observando las características macroscópicas y microscópicas

Agente causal: *Trichophyton verrucosum*

Introducción:

Es causante de las dermatomicosis principalmente en el ganado bovino afectando de forma ocasional a otras especies

Las esporas pueden permanecer en la instalación, en el suelo, otros sustratos y ser viable durante un año, ocasionan la caída del pelo, con formación de costras y escamas en todo el cuerpo.

Especies susceptibles:

En el bovino: Se encuentran en la cabeza, cuello, lados del tronco, la espalda y puede ser todo el cuerpo.

En el ternero: Están alrededor de los ojos, orejas, y final de la cabeza, grupa y rabo.

Pueden afectar también al equino, perros y otros animales domésticos.

Enfermedad: Tiña favosa del ganado bovino

Lesiones: Ocasionan la caída del pelo, con el tiempo se van secando las escamas formando costras

Muestras: Pelos situados alrededor de las lesiones, escamas, y raspados de las costras.

Materiales

- Placas de Petri
- Asas, tijeras y bisturí
- Asas y agujas bacteriológicas
- Agar Saboraud con tiamina (Vit. B1) e Inositol en tubos y en placa
- Agar DTM (Dermatophytus Test Medium) en tubos
- Microscopio óptico de campo claro y estereoscopio
- Porta y cubre objetos
- Hidróxido de potasio 10-40% lactofenol
- Mechero Bunsen
- Tubos que contengan por separado tirosina, caseína, urea, gelatina y almidón
- Agua destilada estéril
- Agar Saboraud CC (con ciclohexamida y cloranfenicol)

Diagnóstico directo:

Examen microscópico del pelo: Al situar el pelo en una sustancia refráctil NaOH al 20%, lactofenol o xilol se ven las esporas, las cuales pueden estar en cadena o distribuidas de forma irregular, pueden estar dentro del pelo (endotrix) o fuera (extotrix). También en las hifas en el pelo puede fragmentarse formando artrosporas.

En las muestras de tiña favosa del ganado bovino se tratan con KOH al 20% o lactofenol, se le sitúa un cubreobjeto y las esporas tienen disposición ectotrix megasporado con cadenas de artrosporas.



El Carácter distintivo de esta especie en Agar Sabouraud es su micelio irregular que se descompone en cadenas de clamidosporas.

Cultivos:

Se siembra en Agar Sabouraud con agregado de tiamina (vitamina B1) + inositol e incubar a 37° de 3 a 4 semanas.

Agar DTM (Dermatophytus Test Medium), este medio es selectivo para el aislamiento ya que contiene un antibacteriano (tetraciclina o gentamicina) y contiene también actidione y ciclohexamida para no permitir el desarrollo de hongos saprofitos; además tiene rojo fenol que determina la producción de NH_3 por la alcalinización que produce el dermatofito en el medio.

Examen macroscópico:

Tiene un crecimiento lento entre 3-4 semanas formando colonias blancas o amarillas, arrugadas con diámetro de 5-10mm, pueden presentar 3 variedades.

1.- Verrugosa, es una colonia pequeña de superficie irregular, verrugosa y color amarillo

2.- Álbum, la colonia es de aspecto esponjoso, color de cera, crecimiento superficial y aureola pulverulenta.

3.- Discoide, es plana a como un disco, lisa y otras aterciopeladas.

Título: Diagnóstico de *Microsporum canis*

Introducción:

Es un dermatófilo zoofílico y es causante de la tiña microspórica, infectan principalmente animales domésticos y se propaga entre humanos.

Animales susceptibles: Perros, gatos, caballos, conejos y bovinos.

Lesión: Caída del pelo en áreas circulares y desprendimiento caudal por descamación de la piel.

Muestras: Pelos de los alrededores de la lesión, escamas, costras mediante un raspado

Materiales

- Placas de Petri
- Asas, tijeras y bisturí
- Asas y agujas bacteriológicas
- Agar Saboraud con tiamina (Vit. B1) e Inositol en tubos y en placa
- Agar DTM (Dermatophytus Test Medium) en tubos
- Microscopio óptico de campo claro y estereoscopio
- Porta y cubre objetos
- Hidróxido de potasio 10-40% ó lactofenol
- Mechero Bunsen
- Tubos que contengan por separado tirosina, caseína, urea, gelatina y almidón
- Agua destilada estéril
- Agar Saboraud CC (con ciclohexamida y cloranfenicol)

Diagnóstico directo:

Observación microscópica de la muestra

La muestra se sitúa en portaobjeto y se añade KOH al 20% o lactofenol, se sitúa encima un cubreobjeto y observa con objetivo seco de 10X y 20X .

Se produce un entothrix microspórico en el interior del pelo formando una vaina de artrosporas como si fuera un mosaico.

En los raspados cutáneos se observan artrosporas u oidíos.

Cultivo:

- Agar Saboraud CC (con ciclohexamida y cloranfenicol)
- Agar DTM se incuba a 25-30°C

Examen microscópico

- Abundantes macroconidias fusiforme, es decir con extremos afilados con 8-10 células
- Se observan hifas en raquetas y clamidosporas (escasas microconidias)

Prueba queratinolítica

Se inoculan pelos, se añade agua para humedecer, tapar las placas e incubar a temperatura 25-30° C, se observa una queratinolisis coaxial.

Las colonias oscilan entre 35-55 cm en su crecimiento en la placa de Petri.

En ambos medios las colonias son serosas y posteriormente blancas, elevadas, profundas e irregulares.

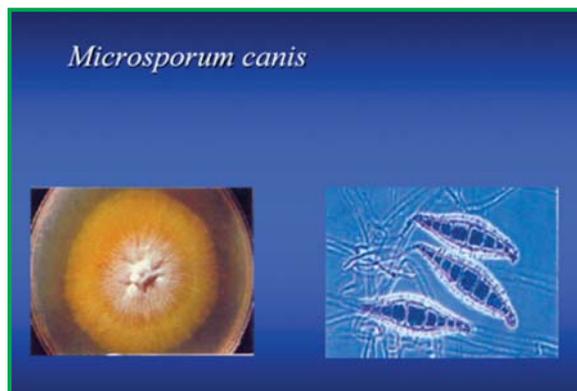
Examen microscópico

Aparecen clamidosporas en cadenas longitudinales pocas macroconidias y abundante microconidias en filamentos o racimos, con un formación de un candelabro fábico

Pruebas biológicas

1. Nutricionales. Tiene un buen crecimiento en caseína + tiamina + inositol, si falta el inositol crece menos y en ausencia de vitaminas no crece.
2. Enzimáticas: Se siembran fragmentos de la colonias en tubos con diferentes sustratos, a las 2-3 semanas a temperatura ambiente se observa que aprovecha (+) a la caseína y la gelatina, poco a la urea y no aprovecha la tirosina y el almidón.
3. Queratinolíticas: Para esto pelos estériles se sitúan en placas y se deposita fragmentos de una colonia, se agrega agua para humedecer y se deja tapada varios días a temperatura ambiente.

En la observación al microscopio se comprueba una queratinolisis coaxial (forma longitudinal), otros lo hace de forma rectangular.



Práctica de Laboratorio No. 4

Título: Diagnóstico del género Candida

Introducción

La candidiasis es una infección aguda y subaguda localizada en mucosas (lengua, vagina, ano); cutánea (pliegues de la piel) bronquio pulmonar, intestinal (causa úlceras que se denominan “Trush” y es importante en aves y cerdos, puede localizarse en el endocardio.

En el perro produce una candidiasis cutánea, en la yegua metritis moniliática y en la vaca mastitis.

Hay factores externos e internos que favorecen la presencia de una candidiasis. En los factores externos, como sucede a personas que trabajan con frutas, etc. y como factores internos se debe al consumo de antibióticos (tetraciclina) eritromicina, etc. la Candida es parte de la flora normal del intestino y los antibióticos afectan a las bacterias y las mucosas favoreciendo su desarrollo, la cual no afecta los antibióticos.

Hay otros factores como: Embarazo, diabétes, hipotiroidismo, mala nutrición, debilidad por padecimiento de una enfermedad infecciosa, tratamiento con corticoesteroides, vejez, infancia.

Enfermedad: Candidiasis

Especies susceptibles: Bovino, perro, personas, cerdo, aves

Lesiones - En la lengua (muguet)

- En la vagina (vulvo vaginitis)
- En los pliegues de la piel (intértrigo)
- En los pulmones (neumonía) es grave
- En el intestino (úlceras, thrush)
- En el ubre (mastitis)
- En el endometrio (metritis moniliática)

Muestras: Se recogen en recipientes esterilizados y se envían identificados; esputo, raspado de mucosas, vísceras, heces fecales y exudado.

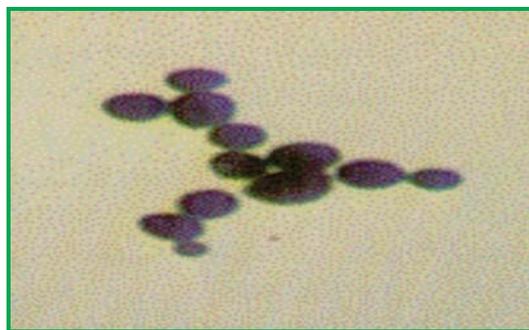
Materiales:

- Portaobjeto
- Asas y agujas bacteriológicas
- Mechero Bunsen
- Microscopio óptico compuesto de campo claro
- Colorantes y reactivos de la tinción de Gram y Giemsa
- Incubadora
- Agar Saboraud CC (con ciclohexamida y cloranfenicol)
- Tubos con azúcares (glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa y rafinosa)

Examen directo:

A partir de la observación clínica de las lesiones o del patólogo junto con la anamnesis y el protocolo de la necropsia se toman las muestras de buches ulcerados (aftas ó thrush) ó exudado de mucosas y se realiza un frotis, teñir con la técnica de Gram con Giemsa. Si es una muestra de zona cutánea o de uñas se utiliza KOH al 20%.

Se observarán células brotantes y ovaladas teñidas de azul como si fueran Gram (+) y sus medidas entre 0.2 – 0.4 mm, además de pseudohifas y verticilios con artrosporas y clamidosporas.



En los casos de brotes negativos, una vía para identificación y clasificación es sembrar en 0.5 cc. de suero sanguíneo o humano e incubar a 37°C.

Otra vía es proceder a su aislamiento y cultivo en Placas de Petri.

Cultivo:

Agar Saboraud CC con ciclohexamida (inhibe hongos saprófitos) con cloranfenicol (inhibe bacterias)

Incubar a 37° C durante 2-7 días

Examen macroscópico:

Son colonias butirosas blancas y brillante después pasan a ser rugosa y membranosa.

Examen microscópico:

Se observan levaduras típicas teñidas de azul. Después se traspara la colonia a un medio específico para comprobar si produce otras estructuras que la identifican como patógenas.

Sembrar en: - Corn Meal Agar
- Clamidospora Agar de Nickerson

Incubar a 37°C en condiciones de microaerofilia

Se observan pseudomicelio, clamidosporas terminales que identifican a la *C. albicans*

Posteriormente se siembra en 0.5 cc de suero humano o en clara de huevo durante 2 horas a 37°C, si produce un tubo germinativo estamos en presencia de: *Candida albicans* ó *Candida stellatoidea*

Para su diferenciación se usa la prueba de la sacarosa (la *Cándida albicans* no la utiliza). En una placa se añade un medio basal libre de carbohidrato junto a 2 ml. de suspensión de levadura y se deja solidificar, encima se sitúa un papel impregnado de sacarosa.

Pruebas bioquímicas

Glucosa: acidez + gas,
Maltosa acidez + gas;
Rafinosa (-),
Lactosa(-),
Sacarosa: acidez.

Inoculación experimental

En un conejo por vía endovenosa se aplica una suspensión de cultivo, la cual causa la muerte a los cinco días.

En la necropsia hay abscesos en vísceras visibles y son características en la parte vertical del riñón.

Práctica de Laboratorio No. 5

Título: Diagnóstico del género *Mycobacterium*

Objetivo:

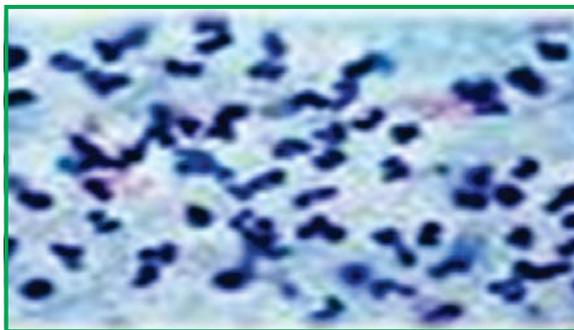
- Conocer los métodos para su identificación
- Conocer el procedimiento para su aislamiento
- Conocer las características macro y microscópicas del agente
- Conocer la prueba de la tuberculina

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo es de curso crónico, infecciosa, clasificada como una zoonosis.

Agente etiológico

- *Mycobacterium tuberculosis* – humano
- *Mycobacterium bovis* – bovinos
- *Mycobacterium avium* – aves
- *M. bovis*: puede afectar también al hombre, cerdos, equinos, perros, gatos, ovejas.
- *M. avium*: puede afectar porcinos, equinos, ovino
- *M. tuberculosis*: puede afectar cerdos, monos, perros, bovinos.



Vía de transmisión

- a) Arógena: Mediante aire-polvo y aire-gota
- b) Oral: Ingestión de agua y alimentos contaminados

Existen otras vías de entrada como es a través de la cópula dando una tuberculosis genital e intrauterina con la afectación del feto. Esta la tuberculosis galactógena al penetrar por el conducto del pezón, también en heridas cutáneas produciendo lesiones tuberculosas como igual sucede en las castraciones de bovinos y porcinos.

Existen diferentes métodos para conocer el estado de infección para la tuberculosis.

1. Método clínico: Se basa en la observación visual o externa de los animales, siguiendo una sistemática para descubrir sus síntomas y signos que son propias o características de la enfermedad.
2. Método alérgico: El bacilo tuberculoso posee una fracción denominada tubérculo-proteína capaz de reaccionar de forma alérgica en animales que están afectados, se llama tuberculina y se debe aun fenómeno de hipersensibilidad cutánea, se puede manifestar de forma sistemática y local.

En la práctica veterinaria es de mucha importancia la prueba de la tuberculina denominada simultánea ya que se aplica en el animal a la vez una tuberculina mamífera y otra aviar; estando el animal afectado por alguno de las dos *Mycobacterium* se producirá una reacción mayor y en el otro lugar menor resultado del cuadro alérgico.

La prueba simultánea se aplica al ganado bovino que resulta positivo primero a la tuberculina de origen aviar y es necesario comprobar no este afectado por *Mycobacterium bovis*.

Se emplea primero con tuberculina aviar ya que es posible el contacto del bovino con *Mycobacterium atípica* y saprofitica y ser antígeno mas específico.

3. Examen anátomo-patológico: Se observan alteraciones anátomo-patológicas de tipo granulomatosa. Esta observación puede ser realizada por inspección micro y macroscópica. Este método requiere de la localización de las lesiones y los granulomas.

4. Método bacteriológico: Es muy importante en el diagnóstico ya que se conocen las propiedades y las características del género, también las reacciones tintoriales (técnica de Ziehl Neelsen) pueden verse microscópicamente en las muestras.

En el aislamiento en el cultivo puro se conoce sus requerimientos nutricionales y además la forma de las colonias.

Permite conocer el tipo de germen presente si es saprófito.

5. Método biológico: Por el tipo de inspección en los animales inoculados dada las diferentes susceptibilidades empleadas en la experimentación se conoce la especificidad y patogenicidad de la cepa de *Mycobacterium* aislada.

Muestras:

Las muestras que mas se envían son los ganglios linfáticos o fragmentos de órganos de animales positivos a la tuberculina o de animales con lesiones encontradas en la matanza. Las muestras se toman según la procedencia se haga en el matadero (lo hace el inspector sanitario) y si es en el laboratorio-

Muestras de:

- Ganglios linfáticos: Se recogen sin seccionar y son depositados en bolsas de nylon correctamente identificado por regiones.
- Región de la cabeza: Submaxilares, sublinguales, parotídeos y retrofaringeos.

- Región torácica: Mediastinico y bronquiales.
- Región abdominal: Hepáticos y mesentericos.
- Regiones superficiales: Prescapulares, inguinales, mamarios y poplíteos.
- Órganos: Pulmón, hígado, bazo, tonsilas, intestino y mamas.

Donde se observan lesiones se remitirán al laboratorio.

- Leche: 10ml. por cuarto de las últimos chorros en tubo estériles.
- Espudo: Mantener el animal en ayunas. Provocar la tos en el animal, depositar la muestra en una Placa de Petri.
- Heces fecales: Se tomaran las que están depositadas en el recto.
- Contenido de absceso: Eliminando primero el contenido purulento las muestras se tomará de la parte interna del absceso.
- Semen: 0.5 – 1 ml. de semen puro depositarlo en tubo estéril.
- Pastos y forrajes de cada cuartón se tomaran muestras de diferentes puntos haciendo un corte a la altura de 2-3 cm. y si la muestra es de suelo se tomará 2-3 cm. profundidad; todas las muestras de cada cuartón se mezclan y se envían 2-3 kg. en bolsas de nylon.
- Agua: Muestras 500 ml. en frasco estéril.

Todas las muestras deben ser conservadas tomando todas las medidas para evitar se disemine la enfermedad.

Datos a enviar: Identificación del animal, número de reacción a la tuberculina, categoría epizoótica de la unidad, fecha de recolección de la muestra.

Materiales:

- ✓ Placas de Petri
- ✓ Guantes, nasobuco y gorra
- ✓ Mortero y su mango
- ✓ Bisturí y pinzas
- ✓ Solución salina fisiológica (SSF)
- ✓ Arena estéril
- ✓ Hidróxido de sodio (2N)
- ✓ Solución de rojo fenol al 1%
- ✓ Centrífuga
- ✓ Acido clorhídrico al 10%
- ✓ Tubos de ensayo con medio de cultivo Petraghani con o sin glicerina
- ✓ Jeringuillas y agujas
- ✓ Hamsters 250-300g
- ✓ Portaobjetos
- ✓ Colorantes y reactivos para la tinción de Ziehl ó Kinyoun (ácido – alcohol, resistente)
- ✓ Microscopio óptico de campo claro
- ✓ Mechero
- ✓ Asa de platino
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Tuberculina mamífera y aviar

Objetivos: del examen bacteriológico

1. Comprobar el diagnóstico realizado en campo
2. Ratificar la inspección de las lesiones en el matadero
3. Evaluar la eficiencia de la prueba de la tuberculina

Examen directo

Se prepara una extensión y se colorea por la técnica de Ziehl-Neelsen (ácido-alcohol-resistente).

Técnica de Ziehl-Neelsen

1. Secar la lamina al ambiente
2. Fijar el microorganismo la lámina mediante flameo suave al calor de la llama.
3. Cubrir la superficie con fushina fenicada
4. Calentar 2 a 3 veces a la llama
5. Si se evapora la fushina añadir mas al portaobjeto
6. Mantener un tiempo de 5 minutos
7. Lavar con agua corriente
8. Cubrir el portaobjeto con alcohol acido por dos minutos
9. Lavar con agua corriente
10. Cubrir con solución de azul de metileno durante 30 segundos
11. Lavar con agua abundante
12. Secar al ambiente
13. Observar al microscopio compuesto de campo claro
14. Con aceite de cedro y objetivo de inmersión se observarán bacterias en forma de bastón teñidas de rojo y fondo de color azul.

Cultivo

Tratamiento de las muestras antes de iniciar su cultivo en los tubos con el medio.

El propósito es eliminar la flora contaminante que se encuentra en las muestras se emplea el método ácido – alcalino, colocar el tejido donde se observan lesiones o fragmentos de ganglios en un mortero de porcelana estéril, añadiendo arena estéril, y unas gotas de SSF (solución salina fisiológica) y triturar con la mano del mortero, el triturado se pasa a dos tubos, uno se conserva en congelación y el otro se descontamina para esto:

Se añade 5 partes de la solución de ácido clorhídrico al 10% de acuerdo con el volumen del material y 2 a 3 gotas de solución de rojo fenol al 1% dejando actuar el ácido durante 20 minutos.

Añadir gota a gota y agitando el tubo, la solución de hidróxido de sodio 2N hasta observar la coloración lila.

Centrifugar a 3,000 rpm durante 20 minutos, con asa bacteriológica del sedimento decantado sembrar en los siguientes medios de cultivo.

- 3 tubos con medio Petraghani con glicerina (no la tolera)
- 3 tubos con medio de cultivo sin glicerina
- 3 tubos con Stonebrink
- 1 tubo con Sula

Pruebas biológicas

Del sedimento que quedó en el tubo, se le añade 2ml. de SSF (solución salina fisiológica) para disminuir la densidad.

Cada muestra se inoculan 2 cobayos en cantidad de 1 ml. por vía intramuscular en la región inguinal.

A los 20 días un cobayo se depila en la región costal, próximo a la línea dorsal y a las 24 horas se le inyecta 0.1ml. (125 U.I.) de tuberculina mamífera por vía intradérmica en la zona depilada. Esto se repite a los 42 días con el segundo cobayo. Clasificación del *Mycobacterium bovis*.

Para llegar a una conclusión es necesario tener en cuenta los siguientes métodos de diagnóstico y después sus resultados llevarlo a un cuadro diagnóstico.

- a) Prueba de la tuberculina –presente en los animales positivos.
- b) Prueba histopatológica presencia macro y micro de lesiones tuberculosas.
- c) Investigación microbiológica con la técnica de tinción Ziehl-Neelsen o Kinoun, se observan bacilos ácido-alcohol-resistente.

Cultivo: Se hace la lectura semanal, con la siguiente:

- * Glicerina, no la tolera, no crece
- * Colonia de color blanco (plátano maduro)
- * Forma circular
- * Crecimiento irregular
- * Superficie lisa
- * Consistencia húmeda
- * Bordes regulares
- * Tiempo de crecimiento 4-5 semanas

Pruebas biológicas

A las 24-48 horas de la inoculación se realiza la reacción alérgica cutánea.

De los 2 diámetros perpendiculares del eritema se obtiene la media, siendo positivo cuando es superior a 5mm.

Al primer cobayo se hace la necropsia mediante un corte por la línea media y se observa:

- Punto de inoculación
- Ganglio inguinal
- Bazo
- Hígado

Se hace frotis de las alteraciones, si la prueba de Ziehl –Neelsen es positiva, la prueba biológica es (+)

Si el eritema es mayor de 5mm y no se observan lesiones en el primer cobayo; la valoración final depende del segundo cobayo y si resulta negativo se descarta la presencia de especies de *Mycobacterium mamíferas* y se admite se debe a cepas atípicas ó saprófitas

Para comprobar se siembra el bazo y el ganglio inguinal del segundo cobayo.

Para la valoración de la prueba biológica si aparecen en la necropsia lesiones y el eritema sea de +5 ó -5 se interpreta positivo. Si no hay lesiones observables en las lesiones se interpreta negativo.

Tabla interpretación

Reacción alérgica		Investigación anatómo patológica	Frotis Directo	Evaluación macro- micro
0-5mm	-	-	-	Neg.
5 mm	+	+	+	Pos.
5 mm	-	-	-	Neg.

Cuadro diagnóstico

Se realiza teniendo en cuenta todos los exámenes: cuando la reacción de la tuberculina es positiva y además:

- a) Positivo el examen anatomopatológico---es positiva la conclusión final
- b) Positiva la prueba biológica---es positiva la conclusión final
- c) Positiva la investigación bacteriológica---es positiva la conclusión final
- d) Negativo si todas las pruebas son negativas

Práctica de Laboratorio No. 6

Título: Diagnóstico del género *Leptospira*

Objetivos:

- ✧ Conocer el procedimiento para el diagnóstico.
- ✧ Conocer el procedimiento para su aislamiento.
- ✧ Conocer las características macroscópicas y microscópicas del agente

Introducción

Es una enfermedad infecto contagiosa que afecta al hombre y los animales y es de curso agudo, subagudo y crónico, a veces en algunas especies tiene forma subclínica. Muchas especies, incluyendo las especies de explotación por el hombre y aquellas vinculadas a la vida doméstica por lo que se considera una enfermedad zoonótica.

Personas vinculadas a vaquería, mataderos y tareas de higienización pública son propensas a ser afectadas.

La vía de transmisión es mediante el contacto con agua contaminadas, con orina de animales enfermos pudiendo penetrar a través de heridas de la piel y mucosas, también los aerosoles de orina son vías de contaminación. Los muridos en especial las ratas son portadoras permanentes y otras especies pueden constituir reservorios como son los animales salvajes.

Patogenia

La enfermedad transcurre en dos fases: una denominada leptospiremia que dura entre 7-10 días donde la bacteria permanece en la sangre con un signo de estado febril por lo que es el momento para tomar la muestra de sangre y continua la otra fase denominada leptospiruria donde el patógeno se localiza en el riñón en particular en las nefronas y es eliminado al exterior en la micción de forma intermitente por un tiempo según la especie, excepto en el hombre donde no sucede y en los roedores es permanente.

Enfermedad: Leptospirosis

Agente etiológico: *Leptospira interrogans* (patógena). Existe la *L. biflexa* (no patógena y saprófita).

La *Leptospira interrogans* posee más de 160 serovares identificados por su afinidad serológica y se agrupan en 25 serogrupos para hacer más práctico el diagnóstico. En la actualidad se han desarrollado vacunas constituidas por varios serogrupos y otras más amplias unidas a otros agentes patógenos.

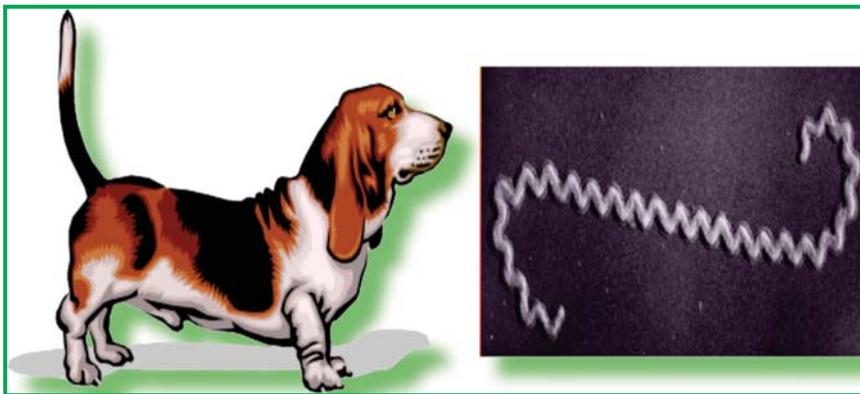
Animales susceptibles:

Bovino: Ocasiona fiebre, anorexia, flacidez mamaria, descenso en la producción de leche, aborto, hemoglobinuria, anemia hemolítica y muerte.

* **Porcinos:** Aborto neonatal, fiebre, anorexia, rigidez de las articulaciones y muerte

* **Equino:** Aborto e/ 7-10 meses, fiebre, ictericia, oftalmia periódica o ceguera lunática, conjuntivitis y edema de los párpados.

* **Canino:** Depresión, vómitos, conjuntiva hiperémica, hematuria, uremia, ictericia y diarrea sanguinolenta.



Materiales:

- ✓ Portaobjetos y cubreobjetos
- ✓ Microscopio óptico de campo claro
- ✓ Microscopio óptico de campo oscuro
- ✓ Pipeta Pasteur
- ✓ Asa bacteriológica
- ✓ Espátula
- ✓ Mechero Bunsen
- ✓ Pinzas, tijeras y bisturí
- ✓ Medio Korthoff
- ✓ Incubadora
- ✓ Conejos jóvenes, curieles y hamster
- ✓ Mortero y mango
- ✓ Jeringuillas de 2 y 5 ml.
- ✓ Aguja hipodérmica
- ✓ Guantes quirúrgicos
- ✓ Tubos con solución salina reguladora (SSR)
- ✓ Solución salina fisiológica (SSF)
- ✓ Solución reguladora de Sorensen
- ✓ Colorantes de Giemsa y alcohol metílico
- ✓ Termómetro
- ✓ Solución de merthiolate
- ✓ Solución de fenol al 5%
- ✓ Pipetas de 1ml. y 5 ml.
- ✓ Placas de Plexi

Muestras:

Esta en dependencia de la fase clínica de la enfermedad. En animales atravesando por la fase de leptospiremia, se toman muestras de sangre para la identificación de anticuerpos en el suero.

- En bovinos, equinos y ovino se hace punción en la vena yugular.

- Porcinos, se hace una punción en la vena marginal de la oreja o vasos periféricos de la cola.

- Caninos se realiza una punción en la vena safena o radial.

Diagnóstico serológico

La sangre debe ser fresca hasta las 24 horas de extracción, conservada a $4-8^{\circ}\text{C}$, no hemolizada y sin anticoagulantes. Se extraen de 5-10 ml. de sangre, y mantienen en tubos estériles con tapón de goma, Si se envía sueros debe ser fresco o congelado en viales.

Diagnóstico bacteriológico

Si se extrae sangre se procede igual, lo único que se aplica anticoagulantes para que no coagule ni sedimente.

La orina no debe pasar de 6 horas de su extracción para evitar su deterioro debido a la acidez, conservarla entre $4-8^{\circ}\text{C}$.

En el caso de un examen post mortem las muestras se envían dentro de las 6 horas y conservadas entre $4-8^{\circ}\text{C}$.

El riñón se envía dentro de su cápsula, del hígado fragmentos de 5 a 10 gr. y la vejiga se envía completa y cerrada dentro de las 6 horas.

Todo envuelto en bolsa de polietileno respectivo con los datos necesarios:

- Unidad, remitente y fecha.
- Clínica observada, numero de animales muertos y enfermos.
- Abortos ocurridos y antecedentes epizootiologicos.
- Señalar si los animales han recibido antibióticos.

Examen directo:

- Observación microscópica: En muestras de orina y agua con pipeta Pasteur o asa bacteriológica tomar 2-4 gotas y colocar en portaobjeto y observar al microscopio con condensador de campo oscuro.
- Cuando son órganos se añaden 2 gotas de SSR (solución salina reguladora) sobre portaobjeto y se frota sobre el mismo un fragmento del órgano, después poner cubreobjeto y observar al menos 10 campos con microscopio de campo oscuro.
- Sangre: Lo primero es centrifugar la sangre con anticoagulante a 500 rpm durante 15 minutos, dejar que decante el plasma y volver a centrifugar a 500 rpm durante 2 horas

Del sedimento se lleva a examen con cubreobjetos en campo oscuro. Puede emplearse un microscopio de campo claro tiñendo con la técnica de Giemsa examinando el mismo sedimento, se ven finos filamentos de color rojo. Cuando se observa las bacterias en campo oscuro se presentan en forma helicoidal (6-20 μm) de largo con ancho de 0.1-0.2mm, con espirales muy próximas y en los extremos tienen forma de gancho.

Tienen un movimiento muy activo sobre si mismo en el sentido de su eje longitudinal, lo anterior junto a su estrecho ancho y flexibilidad permite pase los filtros de membranas miliporos de 45 y 100 micras.

Cultivo:

En muestras de orina y sangre se añaden con pipeta Pasteur 2 a 3 gotas en el medio Korthoff. En muestras de riñones, hígado y feto, lo primero es eliminar la capsula renal o la capsula hepática según sea la muestra de órgano, después con una espátula calentada a la llama se esteriliza la superficie.

En el riñón se introduce la pipeta Pasteur en la zona cortical paralelo a la superficie y en el hígado se toma la muestra en la parte profunda del parenquima hepático. Con los órganos del feto se procede igual, también se siembra líquido estomacal las muestras se depositan en el medio de cultivo Korthoff e incuba a 28-30°C.

Prueba biológica

Se inoculan conejos, hamster y curieles y el inóculo se prepara triturando 1gr. del órgano y se le añade 5ml. de SSR después de un reposo de 30 minutos se usa el sobrenombre.

En caso de orina y sangre con anticoagulante no lleva preparación.

La inoculación en hamster es de 0.5-1ml. por vía intraperitoneal

Conejos es de 2-3 ml. por vía intraperitoneal

Curieles es de 2-3 ml. por vía intraperitoneal

Empleando 2 animales entre cada muestra, los cuales serán analizados por la técnica serológica de microaglutinación.

Examen macroscópico y microscópico

En los tubos de medio Korthoff se observan las “manchas de muere” (nubosidades) y en el microscopio las leptospiras en movimiento con un condensador de campo oscuro.

Los tubos se observan cada 7 días, durante 30 días.

Observación de las Pruebas Biológicas

Se realiza termometría para comprobar el estado febril y se extrae sangre por punción cardiaca con jeringuillas de 5ml. y con aguja de 1". Con la sangre se inocula (2 a 3 gotas) en tres tubos de medio Korthoff. Incubar a 28-30°C y se realiza después un examen macro y micro.

- Sacrificar un animal 4-5 días después de la inoculación .

a) Realizar microscopia de hígado, riñón y orina

b) Realizar siembra bacteriológica de las muestras en medio Korthoff, incubar y observar macro y micro el crecimiento en los tubos.

- Si el primero resulta negativo proceder lo mismo con el segundo animal

- Se toman muestras de sangre de los dos animales en el momento del sacrificio para realizar el diagnostico serológico.

Diagnóstico serológico

Tipificación: Tiene como objetivo la clasificación de la cepa aislada mediante su reacción serológica para determinar su serogrupo. Para esto mediante sus cualidades antigénicas, por la técnica de microaglutinación se presentan frente a una batería de sueros hiperinmunes.

- Obtención de sueros hiperinmunes

a) Se inocula un conejo para cada una de las cepas (serogrupos), con dos dosis de 4ml. cada uno en la vena marginal a intervalos 5 a 7 días usando jeringuillas de 5ml. (la primera dosis la cepa esta inactivada a 56°C durante 30 minutos en baño de María y en la segunda dosis la cepa esta viva.

b) A los 7 días de la ultima inoculación mediante punción cardiaca con jeringuillas de 5ml. obtener 5ml. de sangre de cada conejo sin anticoagulante.

c) Titular los sueros de cada muestra de sangre por la técnica del MAT. Los mismos deben tener título al menos de 1/25000 como mínimo. Si el resultado es inferior se aplicara una tercera dosis de cepa viva a los 7 días.

d) Sangrar totalmente cada conejo a los 7 días de la ultima inoculación.

e) Cada suero se le añade merthiolate 1:10000 ó fenol al 5%, 0.05ml. por cada ml. de suero.

f) Identificar y guardar en refrigeración (4°C)

- Obtención del suero hiperinmune de la cepa aislada

- Proceder igual que lo anterior y para esto:

a) Inocular en un conejo en su vena marginal de la oreja 4ml. de la cepa en dos dosis cada una a intervalo de 5 a 7 días. La primera dosis inactivada a 56°C durante 20 minutos y la segunda dosis en una cepa viva.

b) A los 14-21 días de la primera inoculación extraer 5ml. de sangre mediante punción cardiaca.

Reacción cruzada de la cepa aislada

Utilizando siempre la técnica de microaglutinación (MAT).

a) El suero hiperinmune de la cepa en estudio, obtenido en la inoculación a un conejo se enfrenta a los serogrupos de leptospira conocidos.

b) Enfrentar los sueros hiperinmunes obtenidos en la inoculación a cada conejo con la cepa aislada objeto de estudio del animal enfermo.

c) Realizar un control positivo enfrentando cada una de las cepas del cepario frente a los sueros hiperinmunes homólogos obtenido de cada conejo.

d) La identidad de la cepa en estudio se obtiene al comparar los resultados en las dos baterías (cepas y sueros hiperinmunes), los cuales deben coincidir las reacciones cruzadas.

Técnica de microaglutinación para el diagnóstico serológico

Se basa en detectar anticuerpos en animales que estén afectados, hayan padecido la enfermedad y estén o no vacunados.

Muestra: De sangre coagulada (sin anticoagulante) se separa el suero, decantando en tubos serológicos con su tapa, si es necesario se centrifuga a 1500 rpm durante 20 minutos.

Si no se procesa de inmediato se guarda en congelación en viales. Las cepas que se van a enfrentar al suero problema se mantiene en medio de Korthoff con suero de conejo 10% con pases sucesivos entre 10-15 días.

Antes de usar estas cepas es necesario comprobar su viabilidad y concentración:

- Se observa en el medio de Korthoff las “manchas de muare”
- Se hacen exámenes en portaobjetos con una gota de cada cepa y en microscopio de campo oscuro deben estar en una concentración de 150-200 leptospiras /campo.

Se hacen dos pruebas:

- a) Prueba cualitativa, identifica si hay anticuerpo o no en el suero problema.
- b) Prueba cuantitativa del suero problema en estudio donde se comprobó presencia de anticuerpo, indica cual es su título.

Prueba cualitativa

- Con pipeta de 1ml. depositar 0.4g y 0.9 ml. en SSF en respectivos tubos
- Añadir 0.1ml de suero en estudio al primer tubo y distribuir 0.05ml. en cada una de los pocitos de la segunda fila de la Placa de Plexi cada muestra utilizará una fila.
- Añadir con pipeta de 1ml. 0.05ml de cada una de las cepas en cada una de las filas verticales
- Como control de antígeno con pipeta de 1ml. añadir 0.05 ml. de SSR en la primera fila horizontal y añadir 0.05ml. de cada cepa en correspondencia con su fila vertical. Esto se realiza cuando se sitúan las cepas en la fila vertical.
- Se hacen movimiento rotativos y laterales y se incuban las placas de Plexi a 30°C durante 1 hora
- Preparar láminas portaobjetos con una gota de cada pocito y ver en condensador de campo oscuro
- Es positivo cuando tiene más del 25% de microaglutación.

Prueba cuantitativa.

- Determina título del suero
- Con pipeta de 1ml. tomar 0.2 ml. de la dilución (1/50) del segundo tubo y depositarlo en un tubo serológico que posee 0.2 ml. SSR para obtener una dilución de 1:100.
- De la dilución de 1/100 proceder igualmente añadiendo 0.2ml. de esta dilución en tubo que contiene 0.2ml. de SSF para obtener 1/200 y así sucesivamente hasta obtener diluciones de 1/600 o más.

- Con pipeta de 1ml. añadir 0.05 ml. de cada dilución en su respectiva excavación (pocito)
- Añadir 0.05 ml. de cada uno de los antígenos serogrupos reaccionante o del reaccionante en caso sea una sola muestra positiva
- Mover la placa y después poner una gota de cada pocito en el portaobjeto para observar en campo oscuro.

El resultado se considera positiva cuando se observan mas de ++ cruces lo que indica un 50% de microaglutinación a partir de 1/100.

Bovino: Es positivo a partir de 1/100 para todos los grupos excepto sergrupo hebdomalis que es 1/400

Equino: Tiene que ser a partir de 1/400 para todos los serogrupos todos las demás especies a partir de 1/100 con dos cruces para cualquier grupo.

Se considera el título cuando se observa 50% de microaglutinación en la mayor dilución.

Técnica inmunoenzimatica ELISA (indirecto)

- A cada pocito se añade 100 μ L del antígeno
Lavar con PBS
- Añadir leche descremada al 2%
Lavar con PBS
- Añadir 100 μ L de cada suero a testar previa diluida a 1/50 en PBS mas leche descremada al 0.05%.
- Incubar a 37° C durante 1 hora.

- Lavar 4 veces con PBS a intervalos de 1 minuto.
- Añadir 10 μL de Conjugado (proteína A peroxidasa) diluido a 1/100 en solución de leche al 2%.
- Añadir 100 μL del Conjugado a cada pozo, excepto la columna en blanco. Posteriormente incubar a 37° C durante 1 hora.
- Lavar 4 veces con PBS a intervalos de 1 minuto.
- Se añadió 10 μL de H_2O_2 (ortophenil-peroxidasa) en cada pozo incluyendo la columna en blanco. Se homogenizó e incubó en oscuridad durante 20 minutos.
- Aplicar una solución Stock en cantidad de 50 μL en cada pozo. Homogenizar mediante movimiento.
- Se realiza la lectura con el lector de placas con longitud de onda de 492 nm (espectrofotómetro computarizado para ELISA).
- Se considera positivo (+) cuando el promedio de la lectura en los 2 pozos es superior o igual que el punto de corte (CUT OFF) y negativo (-) cuando el promedio está por debajo.

Práctica de Laboratorio No. 7

Título: Diagnóstico del género *Erysipelothrix*

Objetivo:

- ✓ Saber hacer los procedimientos para el aislamiento e identificación
- ✓ Observar las características microscópicas y microscópicas.
- ✓ Saber realizar la toma de muestras y su envío al laboratorio según la clínica de la enfermedad

Agente causal: *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Introducción.

Es un bacilo Gram (+), no esporógeno y microaerófilo. Causa la enfermedad: Mal Rojo porcino o Erysipela porcina.

La infección afecta preferentemente al porcino, también a otras especies, se introduce por vía digestiva. La orina y heces fecales de animales enfermos poseen microorganismos que contaminan el suelo, alimentos y bebidas.

El suelo posee gérmenes viables y virulentos también las aguas superficiales transmiten la enfermedad y en alimentos con harina de pescado en piensos es portador del agente etiológico.

Las personas vinculadas a la manipulación de conservas cárnicas u otros productos de origen animal pueden infectarse, presentándose formas “erisipeloides” en manos y brazos al penetrar por las heridas, produce dolor en la puerta de entrada, donde el área se enrojece y se torna púrpura apareciendo necrosis en la piel y tejido subcutáneo, los ganglios se infartan y se inflaman las articulaciones.

En el cerdo entre 3-8 meses se infestan con el bacilo del Mal Rojo con una resistencia relativa, en lechones lactantes también puede aparecer.

Se puede presentar en tres formas clínicas aguda, subaguda y crónica.

Clínica de la enfermedad:

1. Forma aguda o septicémica se inicia con la muerte de uno o más animales enfermos. Pueden alcanzar temperaturas de 40°C y presentan rigidez en las articulaciones mostrando zancadas o cojera evidente. Hay respiración dificultosa, hay anorexia, al principio las heces son secas y duras después hay diarrea.

Las lesiones cutáneas urticaria o piel diamantina. Aparecen en el segundo o tercer día; en la piel del cerdo se observan áreas pequeñas de color rosa-claro o púrpura oscuro, elevadas, resistentes a la presión localizándose en la espalda, el lomo y los costados.

En los animales aparecen lesiones formadas por áreas rojo púrpura en la oreja, abdomen y extremidades.

Las lesiones rojo claro o rojo púrpura desaparecen a la semana mientras que las lesiones rojo púrpura-oscuro pueden preceder a la muerte o ser una necrosis de la piel siendo una manifestación crónica.

2. Forma subaguda: Las manifestaciones clínicas se ven disminuidas donde los animales no se muestran enfermos, menos fiebre, afectación del apetito, hay lesiones cutáneas escasas y dura menos el tiempo de la enfermedad.

3. Forma crónica: Presenta alteraciones necróticas con pérdida de porciones de piel, orejas, rabo y patas, cambios en las válvulas del corazón y artritis. Las áreas de la piel necróticas son oscuras, secas y duras que se desprenden formando una escara. Cuando afecta las válvulas cardíacas ocasiona una insuficiencia cardíaca. La artritis produce rigidez y aumento de tamaño de las articulaciones y dificultad en la locomoción.

Animales susceptibles

Además del cerdo, en las ovejas se observa una poliartritis crónica; se considera que en el momento del nacimiento se adquiere el patógeno del suelo, y penetra por el ombligo afectando corderos de hasta 3 meses.

Afectan también vacas, caballos, perros. En las aves afecta pavos, gallinas y palomas causando una septicemia sobreguada.

Muestras:

- Sangre
- Líquido sinovial articular
- Fragmentos de las lesiones cutáneas
- Corazón
- Vísceras como bazo, hígado, riñones

Materiales:

- Portaobjetos
- Colorantes de la tinción de Gram
- Microscopio óptico de campo claro
- Asa y aguja bacteriológico
- Pipeta Pasteur
- Placas de Agar Sangre
- Tubos con caldo nutriente, con suero sanguíneo al 10%
- Jarra de microaerofilia
- Mechero Bunsen
- Incubadora
- Agua oxigenada
- Tubo con Agar hierro de Kliger
- Tubo con medio Edwards con esculina

Examen directo

En muestras de corazón se toman una fracción de la válvula y se realiza un frotis en portaobjeto se ven al microscopio bacilos cortos y finos, rectos o curvados y agrupados en parejas y en grupo siendo Gram (+).

Cultivo:

- Agar Sangre
- Tubos de Caldo Nutriente con suero sanguíneo al 10%, temperatura a 37°C, en microerofilia con CO₂ al 5% durante 48 horas

Examen macroscópico

Se forman 2 tipos de colonias

1. Colonias de tipo "Liso o S"

Son colonias pequeñas, redondas, translúcidas, son producidas por bacilos virulentos de los casos agudos donde los bacilos son cortos y rectos que se agrupan en parejas y en V



Colonias Lisas

2.-Colonias de tipo "Rugosa" o "R"

Son colonias grandes de superficie y bordes irregulares, de formas filamentosas, menos virulentas presente en los casos crónicos.



Colonias rugosas

Al principio en el Agar Sangre se ve una hemólisis alfa difusa (de aspecto verdo-so) alrededor de la colonia y termina en una hemólisis beta total (aclaramiento de la zona alrededor de la colonia).

En tubos con Caldo Nutriente más suero sanguíneo al 10% los bacilos cortos de las colonias “lisas” forman enturbiamiento uniforme, sin película y con poco sedimento.

Los bacilos alargados o “rugoso” produce un crecimiento denso y turbio con sedimento, en medios líquidos no presentan movilidad.

Examen microscópico

En frotis en portaobjeto y tiñendo con Gram se observan bacilos cortos y finos agrupados en “V” o en parejas. Pueden verse filamentos alargados y enroscados. Son Gram (+) débil.

Pruebas bioquímicas

1. En Agar Sangre se añade H_2O_2 al 3% sobre la colonia y se ve que es catalasa (-) al no observarse burbujas.
2. En medio hierro de Kligler incubado durante cuatro días a $37^\circ C$ se observan la producción de SH_2 (color oscuro) Siendo además poco sacarolítico.

3. Sembrando medio Edward's con esculina, no produce hidrólisis de la misma.

Inoculación experimental

En ratones blanco inoculados por vía intraperitoneal de 0.5-1ml. de cultivo en caldo, son susceptibles muriendo en 18 horas de una septicemia aguda.

Reacción serológica:

Se utiliza la técnica de inmunofluorescencia y de aglutinación, esta se efectúa solamente en las formas crónicas.

Práctica de Laboratorio No. 8

Título: Diagnóstico del género Clostridium

Objetivo:

- ✓ Conocer como enviar las muestras
- ✓ Realizar el procedimiento para el aislamiento del agente etiológico
- ✓ Conocer las características microscópicas y macroscópicas

Enfermedad: Ictero-hemoglobinuria bacilar del ganado bovino (IHBB) o “enfermedad del agua roja”

Introducción

La enfermedad es infecciosa de curso agudo y sobreagudo que afecta al ganado bovino en especial, también puede afectar a ovejas y se ha encontrado en porcinos.

La enfermedad se presenta en zonas pantanosas de mal drenaje y pastos con regadío de donde los animales toman las esporas con los alimentos y bebidas, esto sucede principalmente en épocas de lluvia.

Son lesiones características son infartos de color claro (pálidos o anémicos) hallados en el hígado, a partir del cual se inicia la infección, además de amplias hemorragias en el peritoneo parietal, ictericia del tejido subcutáneo, hemorragias puntiformes (petequias) de la corteza renal y principalmente el color rojo oscuro de la orina (hemoglobinuria).

Muestras:

Como el agente etiológico pertenece al grupo de Clostridium – histotóxicos se envía:

- El hígado completo, o partes al mismo donde se incluyen zonas de infarto y tejido sano marginal.

Deben ser muestras frescas con menos de 6 horas de la muerte del animal, pasando el tiempo se conserva en frío a 4°C y enviado al laboratorio dentro de las 24 horas mantenido en bolsa de polietileno nuevas, o en frascos de boca ancha limpio y con tapa. Unir los datos necesarios.

Materiales:

- Portaobjeto
- Colorantes y reactivos de la tinción de Gram
- Mortero y mango
- Pipetas Pasteur
- Asa bacteriológica
- Cloruro de Ca
- Jeringuilla y agujas hipodérmicas
- Curieles
- Cinco tubos con caldo thioglicolato
- Cinco tubos con caldo de hígado con hígado
- Placas de Agar Sangre
- Incubadora
- Mechero Bunsen
- Microscopio óptico compuesto de campo claro
- Maltosa en Agar semisólido
- Medios y reactivos de la prueba de Indol
- Frascos con sueros coaguladores de Loeffler
- Medios y reactivos para la prueba de reducción de nitrato a nitrito
- Pinza y bisturí

Cultivo:

Con una pipeta Pasteur perforar el hígado por los alrededores de la lesión, realizando un frotis el cual teñimos con los colorantes de Gram. Es positivo el examen microscópico cuando se observan bacilos largos y delgados aislados Gram (+), estos bacilos tienen sus extremos redondeados cuando están aislados y rectos cuando están en cadenas. Las esporas son globoides, ovoides o ligeramente alargadas y están situadas en posición terminal.

Se siembra en los medios de cultivo:

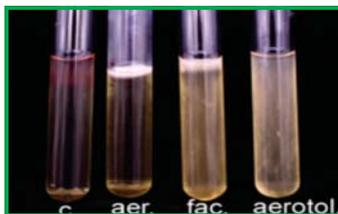
- 5 tubos de agar semisólido de thioglicolato
- 5 tubos de caldo de hígado con hígado
- 5 medios de Kitarow

Los caldos se sitúan en tubos gruesos ocupando el 70% de su volumen, antes de hacer la inoculación se sitúan en baño de María, durante media hora a 100°C y enfriar después rápidamente en agua corriente para que el oxígeno quede eliminado. Debe sembrarse en el fondo del medio para facilitar la anaerobiosis.

La siembra en placas de Agar Sangre fresco se realiza por el método de aislamiento, una placa se incuba en anaerobiosis y la otra se mantiene como control en medio aerobio, la incubación es a 37°C y durante 48 horas.

Observación macroscópica:

En los tubos a las 8-12 horas hay enturbamiento completo, y autoaglutinado, se produce abundante olor a queso.



En las placas de Agar sangre

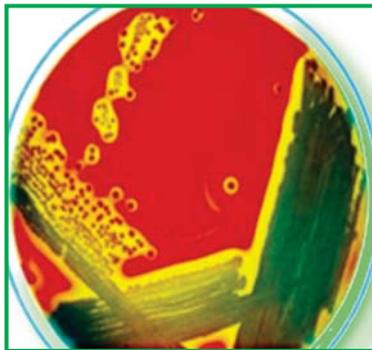
a) Sembradas en medio aerobio

Si no estaba contaminada la muestra no debe haber crecimiento; si hay crecimiento nos da la medida del grado de contaminación, para esto se siembran en caldo para comparar su enturbiamiento con los tubos de anaerobiosis, además se observan esas bacterias en frotis mediante tinción. Posteriormente se inocula en cobayos y depurar la muestra para purificar la cepa de Clostridium.

b) Siembras en anaerobiosis

Si hay colonias de Clostridium, crecen después de 48 horas, se hacen comparaciones con las placas en condiciones aerobias y se hacen frotis para su observación microscópica mediante la técnica de Gram.

Macroscópicamente las colonias de *C. haemolyticum* son pequeñas, con bordes irregulares y con hemolisis difusas (alfa hemolisis).



Observación microscópica del cultivo puro

Con la técnica de Gram (+) se observan bacilos en forma de bastoncitos con extremos redondeados o rectos (en cadenas). Las esporas tienen una espesa pared y son globoideas, ovales y ligeramente alargados situados en la parte terminal o subterminal del bacilo.

Pruebas Bioquímicas:

Para comprobar el aprovechamiento de carbohidratos se debe añadir limalla de hierro al fondo como reductor de oxígeno y 0.25g. de Agar, antes de sembrarlo se deben calentar en medios en baño de María durante 20 minutos y después enfriar de pronto.

Para tomar la muestra se introduce una pipeta de Pasteur a las 2 días de sembradas, hasta el fondo, se rompe la punta y se toma 1 ml. de material, este se lleva a un tubo serológico estéril o vidrio reloj y se añaden 2 gotas del indicador. A las demás pruebas bioquímicas se realiza según su característica y se le añade 0.25 g. de agar para facilitar la anaerobiosis excepto la leche tornasolada.

- Maltosa (+)
- Indol (+)
- Lucuación del suero coagulado de Loeffler (-)
- Reducción de nitratos a nitritos (-)

Prueba Biológica

Un macerado de la muestra de hígado (infartado) tanto de la zona marginal como de la no afectada, se le añade cloruro de calcio al 10% y se inocula 0.5ml. a 2 cobayos por vía intramuscular en la extremidad posterior, se mantiene la observación 72 horas.

Requisitos a tener en cuenta para la siembra:

1. Las placas sembradas situar inmediatamente anaerobiosis.
2. Los medios antes de sembrarlos deben calentarse en agua hirviendo durante ½ hora durante 10 minutos.
3. El exceso de esterilización y de calentamiento da lugar a la formación de peróxido en el medio. Los medios ya calentados no deben guardarse para usar después.

4. Hay que preparar una mezcla de vaselina y parafina a partes iguales (vas-par), después de fundida añadirla a los medios líquidos para sellarlos cuando solidifique y obtener anaerobiosis.

5. No usar gas común, sino gas puro preferente el uso de nitrógeno. Si no es puro pasar por un frasco lavado con pirogalol alcalino.

Prueba biológica

Los cobayos mueren entre 18-36 horas y en la necropsia se observa en el punto de inoculación y sus alrededores un edema sanguinolento sin gas, los músculos subyacentes aparecen de color rojo.

En las cavidades serosas aparecen líquidos sanguinolentos de *C. haemolyticum* (serotipo D) causa también hemoglobinuria.

Se les repite a las muestras de los cobayos los mismos exámenes realizados a las muestras tomadas a las especies afectadas.

Práctica de Laboratorio No. 9

Título: Diagnóstico del género *Streptococcus*

Objetivo:

- ✓ Conocer y saber el diagnóstico en muestras de mastitis
- ✓ Conocer las características macro y micro del agente patógeno

Agente etiológico: *Streptococcus sp.*

Enfermedad: Mastitis estreptocócica



Introducción:

La mastitis se debe a afectaciones localizadas en las mamas, teniendo un proceso inflamatorio con alteraciones anatómo-patológicas diversas, como consecuencia hay una disminución en la producción de leche, afectando su calidad y siendo perjudicial para los productos lácteos.

La mastitis tienen como agentes principales el *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*, también existen otros agentes etiológicos causantes de colibacilosis, tuberculosis, brucelosis, pasteurelisis, etc.

Dentro del género *Streptococcus*, la especie *S. agalactiae* se identifica como el causante del 80% de la mastitis, provocando una mastitis parenquimatosa de aparición aguda, siguiendo un proceso crónico progresivo que produce una fibrosis en la glándula mamaria de los bovinos, actúa además sobre las cabras y otras especies.

El *S. dysgalactiae* actúa en 10% y es más aguda, pero con menos tendencias a la cronicidad.

El *S. uberis* es aguda también con incidencia en un 10%, luego se hace crónico, siendo de un efecto transitorio.

Muestras: Leche de animales con mastitis clínica o subclínica que sean positivas a la prueba de White Side o California, cumpliendo el procedimiento para la toma de muestras.

Materiales:

- Portaobjeto
- Colorantes de la tinción de Gram
- Placas con Agar Sangre de carnero al 5%
- Caldo nutriente con suero sanguíneo al 10%
- Mechero Bunsen
- Asas bacteriológicas
- Microscopio óptico de campo claro
- Placas con medio Edward's con esculina
- Placas con Agar sangre al 5% con *Staphylococcus aureus* beta hemolyticum para la prueba de CAMP
- Tubos con caldo bilis al 40%
- Tubos con insulina
- Tubos con sorbitol
- Tubos con hipurato de sodio
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Examen directo:

Preparación de las muestras

- Comprobar sea positiva la prueba de California o la prueba de "White Side" o la prueba de azul de bromotimol.

- Incubar la muestra 4 horas antes de sembrada en placas
- Centrifugar a 2,500 rpm/15 minutos y del sedimento hacer tinción con el colorante de Loeffler, Giemsa o Gram.
- Proceder directamente a hacer un frotis, para esto:

Hacer frotis en área de 1cm² en portaobjetos, secar y fijar para teñir por la técnica de Gram.

Se observan cocos Gram (+) en parejas o en cadenas de tamaño variable.

Cultivo:

- Sembrar con asa bacteriológica 10 µL de leche

a) Placas de Agar sangre de carnero al 5%.

b) Tubos de Agar Nutriente como suero sanguíneo al 10% incubar en CO₂ al 5-10% (microaerofilia) a 37°C durante 24-48 horas.

Examen macroscópico

Se observan colonias pequeñas incoloras, transparentes, parecidas a “gotas de rocío”, producen una zona de hemólisis alfa y beta o no dan hemólisis, según la cepa.

En los tubos en caldo produce flóculos que van al fondo y un líquido sobrenadante.

Examen microscópico:

Al teñirla con Gram, son (+) agrupados en cadenas o en parejas.

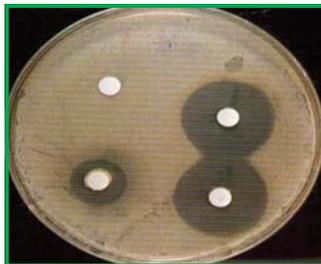
Pruebas bioquímicas

Procedimiento para identificar la especie del género *Streptococcus* con las siguientes pruebas bioquímicas.

- Catalasa (-) la cual lo diferencia del *Staphylococcus*.
- Siembra en tubo con caldo bilis al 40%
- Prueba hipurato de sodio se incuba a 37°C (4 días)
- Prueba hidrólisis de la esculina
- Prueba acidificación de la esculina
- Prueba acidificación del sorbitol
- Prueba de CAMP (esta prueba consiste en hacer una estría en Agar Sangre con un *Staphylococcus aureus* de doble hemólisis (alfa y beta) y de forma perpendicular hacer una estría en el mismo Agar Sangre con el *Streptococcus* a clasificar, se incuba a 37°C por 24 horas y después a refrigeración de 6-12 horas.

Es positiva cuando el *Streptococcus* forma una sombrilla de hemólisis en donde coincide con la hemólisis del *Staphylococcus* ampliándose la zona de hemólisis alfa y después beta.

Tabla	Crecimiento en el caldo bilis al 40%	Hipurato de sodio	Hemólisis Edwards con esculina	Insulina	Sorbitol	CAMP
<i>S. agalactiae</i>	+	+	-	-	-	+
<i>S. dysgalacteae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. uberis</i>	-	+	+	+	+	+
			Colonias negras			



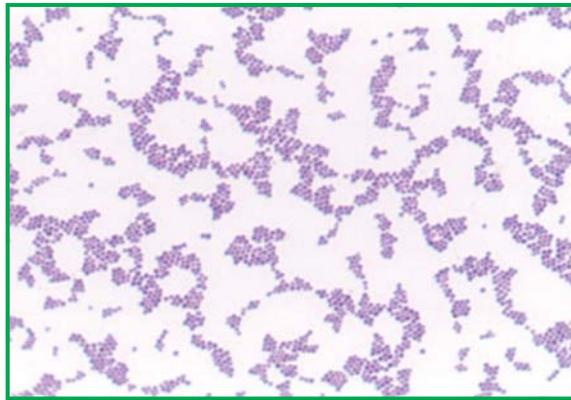
Práctica de Laboratorio No. 10

Título: Diagnóstico del género *Staphylococcus*

Objetivo:

- ✓ Conocer el procedimiento para su aislamiento e identificación
- ✓ Conocer las características macroscópicas y microscópicas del genero

Agente etiológico: *Staphylococcus aureus*



Enfermedad: Estafilococosis

Introducción:

Esta muy difundido en la naturaleza y forma parte de la flora normal de la piel y las mucosas del hombre y animales, principalmente en las partes altas de las vías respiratorias.

Pueden proceder de productos de origen animal como la leche y la carne y de personas enfermas que lo han manipulado o de animales enfermos.

Se encuentra en aguas contaminadas y se consideran oportunistas al causar infección de la piel, ojos, oídos, nariz, garganta.

El *S. aureus* esta en los procesos supurativos de heridas en el hombre y animales.

Animales susceptibles:

- En vacas, ovejas y cabras: producen mastitis
- En corderos: producen piemias
- En perro: Dermatitis pustulosa contagiosa
- Equinos, vacunos y porcinos produce batriomicosis

En el humano produce las siguientes enfermedades:

- Impétigo infantil
- Forúnculos
- Abscesos
- Osteomielitis
- Mastoiditis
- Endocarditis
- Tonsilitis
- Foliculitis conjuntival
- Sinusitis
- Queratitis ulcerativa
- Enterotoxemia

Patogenia

Depende la toxina producida y la reacción de los tejidos del hospedero. Actúan enzimas y toxinas estafilococicas.

Las enzimas que actúan son las siguientes:

- Coagulasa: Coagula el plasma sanguíneo evitando la fagocitosis
- Fibrinolisinis: Lisa el coágulo de fibrina para extender la infección establecida a otros tejidos.
- Leucocidina: Destruye los leucocitos

- Hialuronidasa: Destruye el ácido hialurónico (cemento intersticial) de los tejidos para invadir otros tejidos.

Las toxinas

- Demonecrotina: Necrosa la piel sobre el absceso o forúnculo para evacuar el pus (esta formado por células o leucocitos muertos) produce la dermatitis postular del perro.

- Letal-toxina: Causa la muerte del paciente al pasar a la sangre.

- Hemolisina: Destruye los hematíes produciendo anemia. La (beta) hemolisina destruye todos los hematíes y la (alfa) solo los destruye parcialmente. En los animales las cepas patógenas producen alfa y beta (vacunos y carneros).

- Enterotoxinas: Causa la intoxicación alimenticia cuando se consumen alimentos con esta toxina preformada que resiste la acción del jugo gástrico y produce irritación de la mucosa gástrica y entérica provocando vómitos y diarreas.

Las enterotoxinas resisten el calor de 100°C durante 30 minutos y estas cepas producen también hemólisis alfa y beta y son cepas de origen animal, además son coagulasa (+).

Son sensibles el hombre, gatos, lechones y el perro. Las toxinas se identifican mediante la extracción, purificación y concentración de la toxina para después proceder a la técnica de inmunodifusión utilizando un suero antitóxico específico.

Muestras:

Leche, pus, sangre, alimentos contaminados, vómitos, heces fecales, exudados nasales, faríngeos, otícos, y oculares, etc.; muestras de leche de animales con mastitis.

Materiales

- Portaobjetos
- Colorantes para la tinción de Gram
- Mechero Bunsen
- Microscopio óptico de campo claro
- Asas y agujas bacteriológicas
- Placas con Agar Sangre de carnero al 5%
- Tubos con Caldo Nutriente
- Tubos con Caldo Carne Salino (10% Cl Na)
- Incubadora
- Tubos con Agar Nutriente con 0.5% de glucosa con indicador de pH
- Tubos con Agar manitol
- Placas con "Staphylococcus Medium 110"
- Indicador azul de bromotimol
- Solución saturada de sulfato de amonio al 50%
- Agua oxigenada (H₂O₂) peróxido de hidrogeno
- Plasma humano o de conejo para la prueba (bioquímica) de la coagulasa.

Examen Directo

Se realiza una extensión o frotis sobre un portaobjeto con la muestra (leche, pus, sangre, etc.).

Se puede incubar o no las muestras de leche durante 4 horas depende el grado de contaminación de otras bacterias saprofitas que pueden entonces proliferar juntos al agente patógeno.

Se tiñe con las técnicas de Gram y Giemsa, en los medios líquidos pueden observarse pares de cadenas cortas y pocos racimos. En la sangre y pus se forman "racimos". No se observan esporas, ni flagelos, ni cápsulas son células esféricas (cocos) Gram (+).

Cultivos:

I. En muestras no contaminadas se siembran:

- Placas de Agar Sangre por el método de aislamiento (estrías)
- Tubo de caldo nutriente
- Incubar a 37°C durante 24 horas

En muestras contaminadas

- Medio enriquecido selectivo "Salt Meat Broth" (caldo de carne con sal) el cual tiene un 10% de cloruro de sodio para eliminar a los contaminantes no halofílicos e incubar a 37°C durante 24 horas.

Examen macroscópico

Las colonias a las 24 horas son grandes, redondas, lisas, brillantes de color dorado (aureus). Son de aspecto butiroso y la colonia está rodeada de hemolisis alfa.

Las cepas de origen animal tiene sus colonias en Agar Sangre doble hemolisis, una total próxima a la colonia y otra externa oscura mas ancha de hemolisis parcial, la cual se acentúa si la placa se pone en frio. Se percibe mayor con sangre de carnero que de bovino.

Estas cepas producen por lo general enterotoxinas (causando intoxicaciones alimentarias).

Observación macroscópica

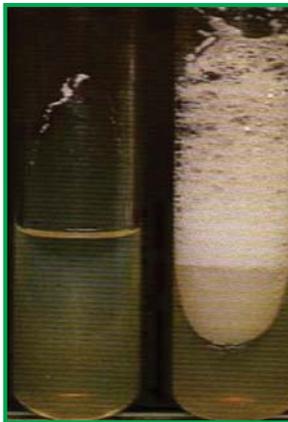
En tubos con caldo produce, una turbidez, uniforme y un sedimento pulverulento, formándose un ligero anillo en la superficie del medio.

Examen microscópico:

Por la coloración de Gram son (+) formando racimos, siendo raras las cadenas y las parejas de cocos.

Pruebas bioquímicas:

1. Fermenta la glucosa (+) en un tubo con Agar nutriente con 3.5% de glucosa se observa cambio de color del indicador de pH.
2. Acidifica el manitol (+) sembrado en cuña con Agar manitol por estría y punción, se observa acidificación aerobia y anaerobias.
3. Prueba de la catalasa (+) en un portaobjeto se sitúa H_2O_2 y después un fragmento de la colonia y se observa desprendimiento de gas.



Prueba de la catalasa

4. Prueba de la coagulasa (+), en un tubo de plasma humano o de conejo se inocula y a las 24 horas coagula el plasma lo indicara su patogenicidad y virulencia. La observación se hace cada 15 minutos hasta las 3 primeras horas después a las 24 horas. El cultivo no debe tomarse de una colonia que haya crecido en medio salino.

II. En muestras contaminadas:

Examen macroscópico

En los tubos con Caldo de Carne Salino (cloruro sodio al 10%). Se observa turbidez uniforme un sedimento pulverulento, con un anillo ligero en la superficie.

Examen microscópico

Con la tinción de Gram, son células teñidas, de azul formando racimos .

Cultivo:

Del Caldo de Carne Salino se siembra en el medio selectivo “Staphylococcus Medium 110” a 37°C durante 48 h. apareciendo una colonia con pigmentos anaranjado.

Prueba bioquímica:

Acidificación del manitol se comprueba añadiendo una gota de azul de bromotimol a una colonia típica dando un color amarillo indica la acidificación del manitol (+).

La hidrólisis de la gelatina se añade a la colonia una solución al 20% de ácido salicílico apareciendo una zona clara alrededor de la colonia “reacción de Stone”.

Se realiza la prueba de la catalasa, glucosa y coagulasa.

Práctica de Laboratorio No. 11

Título: Diagnóstico del género *Escherichia*

Objetivos:

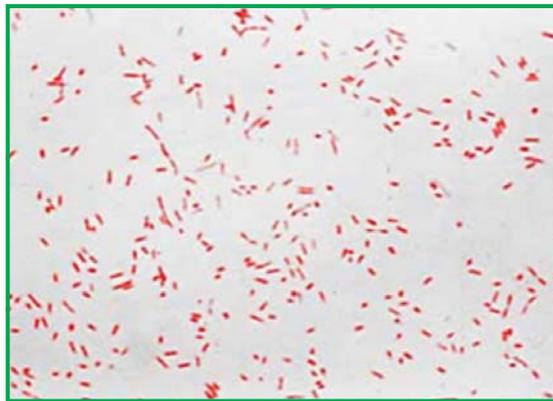
- a) Conocer y hacer el procedimiento para el aislamiento del género
- b) Observar las características macroscópicas y microscópicas
- c) Seleccionar el envío de muestras

Introducción:

Constituye un componente de la microflora normal del tracto digestivo de personas y animales, dentro de la especie existen algunas identificadas antigénicamente las cuales son patógenas.

Su acción fundamental en la producción de enterotoxinas creando un cuadro septicémico y diarreico.

Agente Etiológico: *E. coli*



Enfermedad: Septicemia, enterotoxemia, diarrea enterotóxica

Animales susceptibles y lesiones.

Actúa en diferentes especies y preferentes en animales jóvenes.

Bovino: En los terneros produce septicemia y diarrea enterotóxica (diarrea blanca) siendo la más frecuentes como resultado de la implantación del *E. coli* enteropatógeno en yeyuno y ganglios mesentericos con la acción local de la enterotoxina liberada por la bacteria ocasionan un desequilibrio en el transporte de electrolitos y agua a través de la mucosa intestinal.

La adhesión de la bacteria a la mucosa intestinal se debe a las adhesinas localizadas en las fimbrias cuya expresión antigénica es el antígeno K: 99.

Produce además en el ternero onfaloflevitis y poliartritis.

En el bovino adulto produce pielonefritis, cistitis, cervicitis, metritis y mastitis.

Porcino: En cerdos recién nacidos produce septicemia y diarrea enterotóxica, donde la expresión antigénica en la adhesinas son los antígenos K: 88 Y K: 99.

En cerdos después del destete se presenta con frecuencia la entero toxemia, unido a otras cepas de *E. coli* que son hemolíticos desarrollándose de la implantación de las cepas en el yeyuno y ganglios linfáticos.

Pollos: Origina una coligranulomatosis del intestino debido a cepas encapsulada de colibacilos. Conocido también como enfermedad de Harre.

También produce en los sacos aéreos una aerosaculitis.

Personas: Produce una gastroenteritis fatal para los menores, también infecciones en el conducto urogenital, diarrea y neumonía.

Muestra:

- Exudados rectal (previa desinfección con alcohol al 70% en la región perineal).
- Heces fecales.
- Vísceras: Intestino (yeyuno), hígado, bazo, riñón, ganglios, huesos largos, pulmón y otros órganos lesionados.
- Leche

• Aves enfermas y muestras.

Las muestras se conservan en congelación a 4°C

Materiales:

- Láminas de portaobjetos
- Colorantes de Gram.
- Aceite de inmersión
- Microscopio óptico de campo claro
- Placas de Petri con Agar Verde Brillante
- Placas de Petri con Agar Sangre de carnero al 5%
- Medios reactivos para la prueba de Indol
- Espátula
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Incubadora
- Tubos con Agar hierro de Kligler
- Medios y reactivos para la prueba Rojo Metilo y Vogler Proskauer
- Tubos con Agar Simmons citrato y Malonato sódico
- Tubos con Agar urea Christensen
- Tubos con Agar semisólido
- Medios y reactivos para realizar la prueba del Indol

- Antisueros polivalentes de grupo
- Asas y agujas bacteriológicas
- Mechero Bunsen
- Suero para tipificación (K88 y K99)

Examen directo:

Con las muestras se hacen un frotis teñido con Gram, observándose bacilos cortos, Gram (-) que varían de formas cocoides hasta largos filamentos.

Cultivo:

1. Agar Verde Bilis Brillantes
2. Agar Sangre de Carnero (5%)
3. Tubos con Caldo Verde Bilis Brillante al 2%

Incubar a 37°C durante 24 horas

Observación macroscópica

En Agar Verde Brillante, las colonias son redondas, de borde liso, convexos y de color amarillo verdoso (aprovechamiento de la lactosa).

En Agar sangre de carnero al 5%, se desarrollan colonias de borde liso, convexo y gris presentando hemólisis completa e incompleta.

En tubos con Caldo Bilis Verde Brillante al 2% se produce un enturbiamiento difuso con un sedimento denso, sin formar película.

Si se utilizan tubos de fermentación Durham's ascienden hacia la superficie debido a producción de gases.

Observación microscópica

A partir de las colonias crecidas en caldo se hacen frotis y al teñirla con Gram, se observan bacilos cortos (-) variando hasta formas cocoides pueden verse algunos bacilos largos.

Pruebas Bioquímicas

- En Agar hierro de Kligler produce ácido y gas aprovechando la glucosa y la lactosa, el medio adopta coloración amarilla y las colonias son de aspecto blanco, amarillentas, húmedas y brillantes. No produce SH_2 .
- Prueba RM-VP (Rojo de Metilo-Voges Proskauer, es RM(+) y VP(-).
- Siembra en tubos de Malonato sódico (-) (no lo utiliza como fuente de energía)
- Siembra en tubos de Simmon's citrato (-) (no lo utiliza como fuente de energía)
- Tubos con agar semisólido – no es móvil
- Prueba de Indol (+) (se observa en el tubo un anillo rojo en la superficie)
- Tubo con Urea, no la hidroliza (-)
- Serotipificación
- En muestras de terneros y cerdos diarreicos se realiza:
 1. Seroaglutinación rápida en lámina de 10 colonias compatibles con el *E. Coli* crecidas en Agar Verde Brillante con el suero K 99 en terneros y el K88 y K99 en cerdos. Para esto se añade una gota de cada uno de los sueros en un portaobjeto y sobre esto se sitúa un fragmento de colonia si aglutina es (+).

2. En los terneros, los resultados se realizarán de acuerdo a la presencia o no de colonias de *E. coli*, K99 de donde se interfiere que el patógeno participe en el síndrome diarreico, pueden haber otros gérmenes patógenos.

3. En cerdos los resultados se miden en base de las colonias (+) a K88 y K99, siendo:

Para el esquema antigénico se puede efectuar según la existencia de 3 clases de antígenos

Ag "O" – somático

Ag "H" – flagelar

Ag "K" – capsular

Se emplean también para identificar cepas K88 y K99 mediante la técnica de inmunofluorescencia directa.

Práctica de Laboratorio No. 12

Título: Diagnóstico del género Salmonella

Objetivo:

- ✓ Conocer y hacer el diagnóstico para identificar el Género Salmonella
- ✓ Conocer sus características macroscópicas y microscópicas
- ✓ Seleccionar y obtener las muestras para enviar al laboratorio

Introducción:

Produce en el cerdo de todas las edades una infección, siendo más frecuente en lechones.

Para su estudio, además del género, existe un nivel taxonómico de subgénero y otro de especie.

Ocasiona en esta especie una infección entérica aguda aunque no son raras las formas septicémicas y respiratoria.

Son bacterias Gram (-), no esporógena y anaerobia facultativa.

Agente etiológico: *Salmonella enteritidis*. *Salmonella choleraesuis*

Enfermedad: Salmonellosis (enteritis necrótica del cerdo, paratífus del lechón)



Patogenia:

El hospedero penetra por vía oral, se multiplica en el intestino asociado a las placas de Peyer y finalmente a los ganglios mesentéricos, pasa al torrente circulatorio hasta localizarse en diferentes órganos, produciéndose un cuadro patológico entérico, septicémico o respiratorio ó estar como portador asintomático.

Animales susceptibles: Cerdos, bovinos, perros, aves y el hombre.

Hombre: Ocasiona una toxi-infección alimentaria (variedad Kunzendorf), también puede ocasionar una infección urinaria, neumonía y septicemia mortales. Se transmite por la ingestión de alimentos y bebidas contaminadas por heces de animales infectados.

Muestra:

- Exudado rectal
- Heces fecales

Vísceras: intestino, hígado, bazo, riñón, ganglios

Vómito y alimento contaminado

Huesos largos, pulmón y otros órganos lesionados)

Las muestras se deben tomar en forma aséptica, mantener en frascos estériles y conservar a 4°C en congelación.

Examen directo de la muestra

Se observan bacilos cortos y gruesos, Gram. (-), no esporogenos.

Materiales:

- Láminas de portaobjetos
- Colorantes de Gram. -Kit de Gram
- Aceite de inmersión
- Microscopio óptico de campo claro
- Placas de Petri con Agar verde brillante
- Placas de Petri con Agar Sangre de carnero al 5%
- Tubos con caldo Kauffman
- Espátula
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Incubadora
- Tubos con Agar hierro de Kliger
- Medios y reactivos para la prueba Rojo Metilo y Vogler Proskauer
- Tubos con Agar Simmons citrato y Malonato sódico
- Tubos con Agar Urea Christensen
- Tubos con Agar semisólido
- Medios y reactivos para realizar la prueba del Indol
- Antisueros polivalentes de grupo
- Asas y agujas bacteriológicas
- Mechero Bunsen

Cultivo:

- Placas de Agar Verde Brillante
- Agar Sangre de carnero (5%)
- Tubos con caldo de Kauffman
- Se incuba a 37°C durante 24 horas

Observación macroscópica

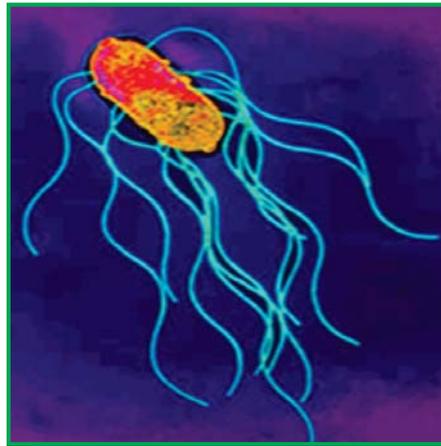
- En Agar Verde Brillante: Se caracteriza las *Salmonella spp* por ser sus colonias de forma redonda, de borde liso convexo y de color rosado (por no utilizar la lactosa).

- En Agar Sangre de carnero al 5%: Sus colonias son redondas de borde liso, convexas y grises, no presentan hemólisis

- En caldo Kauffman: Presentan una turbidez uniforme; de aquí se pasan a placas con Agar Verde brillante

Observación microscópica del cultivo

Son Gram. (-), bacilos cortos, gruesos



Pruebas bioquímicas

Agar hierro de Kligler, la *S. cholerae* produce ácido y gas de la glucosa, no fermenta la lactosa y no produce SH_2 .

El cambio de coloración a amarillo (aprovechamiento de la glucosa) es hacia abajo y la coloración roja (hacia arriba de la cuña, lo que indica no aprovechamiento de la lactosa).

La variedad Kunzerdorf, se observa negro en el lugar de la punción.

Tubos con Malonato sódico (-)

Tubos con Simmons-Citrato, lo utiliza la var. Kunzendorf tomando color azul.

En agar semisólido -presenta movilidad

- En tubos con urea (-) no la hidroliza
- Indol (-) no se ve el anillo Indol en la superficie
- Prueba RM-VP (Rojo de Metilo-V. Proskauer) resulta RM(+) Y
- VP(-).

Serotipificación

Se basa en el esquema de Kauffman-White, sobre la estructura antigénica de todas las especies del género Salmonella.

1-Antígeno "O" somático.

2- Antígeno "H" flagelar

Los antígeno "O" (somático) se encuentra constituyendo parte de la pared celular y se obtiene calentando la suspensión bacteriana a 100°C para destruir los Ag "H" (flagelares), después se extrae con alcohol caliente. Los Ag "O" se identifican por números (1,2,3, etc). Cada especie puede tener varios Ag "O" y a la vez comparten algunos antígenos, se forman los serogrupos, es decir, antígenos de grupo identificados con las letras A,B, C, etc.

Los antígenos "H" (flagelares) están constituyendo los flagelos y se someten a la acción de formol que fija los flagelos a la Salmonella. Los Ag "H" son difásicos y se designan como "fase 1" o (específica) y fase 2 (o inespecífica). Los primeros (Fase 1) se identifican (a,b,c...) y los de la (fase 2) se identifican con números (1,2,3...).

Para proceder a la serotipificación de las salmonella se mezclan una gota de la suspensión bacteriana con una gota de antisuero polivalente del género; se aglutina entonces se mezcla una gota de la suspensión bacteriana (colonia) con una gota de cada uno de los antisueros de grupo (a,b,c..etc.) y se continua hasta identificar el serotipo: ejemplo: C1: 6,7 Ag "H" (fase 2)

Práctica de Laboratorio No. 13

Título: Diagnóstico del género Brucella

Objetivo:

- ✓ Conocer el procedimiento para su aislamiento e identificación
- ✓ Conocer las características macroscópica y microscópica del Género

Introducción:

La brucelosis constituye una bacteremia con una evolución desde la forma aguda a la crónica, siendo sus manifestaciones de carácter inflamatorio. Constituye una zoonosis.

Lesiones y animales susceptibles

Vaca: Produce aborto en la segunda mitad de la gestación, placentitis, cotiledonitis, retenciones placentarias y mastitis intersticial.

Toro: Produce orquitis y artritis

Hombre: Cefalea, aborto, fiebre ondulante.

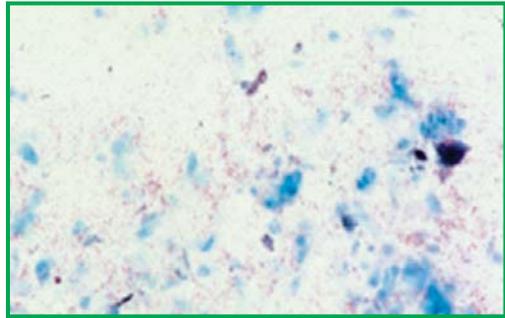
Equino: Bursitis, fistula no traumática (talpa ó testera) y el “mal de la cruz”.

Cerdos: Abortos, mastitis, parálisis de las extremidades posteriores, debido a una espondilitis lumbar.

Otras especies son susceptibles tales como: el caprino, ovino, canino (esporádicamente); entre los animales silvestres se encuentran los múridos.

Dentro del género Brucella existen especies muy afines a determinado hospedador, aunque las tres primeras pueden infectar a otras especies.

B. aborto – bovino
B. suis - porcino
B. melitensis – cabras
B. ovis – ovinos
B. canis – perros
B. neotome – ratas



Patogenia:

En su acción invasiva la Brucella tiene predilección por las glándulas sexuales, donde se nutren de un alcohol carbohidratado (Eritritol) que produce el útero grávido del vacuno. También en las glándulas sexuales y en las articulaciones se crean condiciones favorables.

En el bovino se presenta una bacteriemia localizada en el útero y en la mama, en cambio en el cerdo y el hombre son frecuentes las bacteriemias, asunto a tener en cuenta para el muestreo.

Muestras:

- Muestras de leche para realizar la prueba del anillo de la leche.

Como requisito deben de ser animales en producción que no estén padeciendo mastitis.

Se procede tomando pequeñas cantidades de cada cuarto, mezclar de forma homogénea con la leche de 8-10 animales.

Remitir al laboratorio con tubos con una gota de solución de formalina al 10% manteniéndola en 4-8°C hasta 24 horas.

- Muestra de sangre

Con agujas estéril extraer y depositar de 5 a 10 ml. en tubos con su identificación, tapar los tubos y mantener en reposo con un ángulo de 45º para que se forme el coagulo.

Enviar al laboratorio conservada en 4-6°C y se aceptara si no hay hemólisis, no lipémica y libre de sustancia extrañas.

- Muestra para análisis bacteriológico

1. De las especies bovino, ovino, caprino, porcino

a. Cuando es un aborto: Enviar el feto abortado con sus envolturas, mejor completo, si no el estómago y sangre en frasco estéril. Enviar además placentas con sus cotiledones y nódulos.

b. Si es de un animal sacrificado tomar fragmentos de 10cm. de hígado, corazón, bazo, útero, (con feto si esta gestante) ganglios linfáticos supramamarios, retrofaríngeo, iliacos internos y lumbares, fragmentos de 10cm. de cada pezón de la ubre y en los machos testículos y vesículas seminales.

c. Leche: Tomar 10ml. De cada cuartos de los últimos chorros en frascos estériles sin conservantes químicos.

d. Orina: Tomar 10ml. con catéter en frasco estéril

e. Exudado vaginales: Tomar con hisopo estéril en caso de aborto se toma la muestra 20 - 28 días después.

f. En la especie equina: Tomar pus, muestras de los abscesos de la cruz y de la región occipital.

Materiales:

- Placas con Agar Triptosa Sangre
- Solución salina fisiológica
- Reactivos y colorantes para realizar la tinción de Gram
- Porta objetos
- Tijeras y pinzas
- Arena estéril
- Incubadora
- Jarra de microaerofilia
- Centrífuga
- Microscopio óptico de campo claro
- Alcohol etílico
- 2 cobayos y sus jaulas
- Jeringuillas de 3ml,
- Agujas hipodérmicas No. 23-25
- Tubos de fondo plano
- Asas y agujas bacteriológicas
- Mechero Bunsen
- Placas de Petri
- Agar suero dextrosa con los colorantes tionina y fuchina en diferentes concentraciones
- Tubos con medios de Christensne para ureasa
- Tubos con solución de urea
- Tubos con Agar suero dextrosa
- Papel indicador de acetato de plomo
- Suero para pruebas de aglutinación
- Reactivos químicos y bioquímicas

Examen directo:

Siembras de las muestras:

1. Órganos: se cortan y el fragmento se frota sobre dos placas con Agar Triptosa sangre.

Cuando va a estudiarse tejido de órganos de gran tamaño se elimina la grasa de los órganos, sumergirlas en alcohol etílico y flamear; se añade a un mortero con arena estéril y mezclar con SSF en proporción 1:10, de aquí sembrar con asa bacteriológica en el mismo medio de cultivo

2. Placentas: Cortar fragmentos de las zonas con alteraciones y pasarla por varios frascos de boca ancha que poseen SSF. y el último frasco tiene alcohol al 95% y flamear

a. Los fragmentos cortados se frotran sobre la superficie del medio de cultivo.

b. En órganos y placentas después de sembrados, se realiza un frotis con el mismo fragmento presionándolo sobre el portaobjeto para su observación microscópica.

c. Fetos abortados: El contenido estomacal se siembra con asa bacteriológica y los órganos se frotran fragmentos sobre la superficie del medio .

d. Secreciones: Con asa bacteriológica se siembra por estrías en medios sólidos. De las muestras líquidas o semilíquidas se extienden con el asa sobre un portaobjeto.

e. Leche: Primero se centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos, se siembra del sedimento en los medios por estría y se hace una extensión en portaobjetos.

Incubación de los medios de cultivo en placas.

La mitad de la placa de Petri se incuba en ambiente aeróbico y microaerofilia con 10% de CO₂.

Procedimiento para obtener microaerofilia:

1. En el fondo de una jarra donde están situadas las placas se coloca una vela, se enciende y tapa de inmediato, esto hace se agote parte del oxígeno y se incorpore al interior de la jarra CO_2 .

2. Utilizar también 0.4g de bicarbonato de sodio y 0.35ml. de ácido clorhídrico concentrado por litro de capacidad de la jarra.

Se procura inclinando la jarra los dos reactivos se unan.

3. 4.46 ml. de bicarbonato de sodio al 8.4% y 4.46ml. de ácido sulfúrico al 3.3% Mezclar momentos antes de cerrar el recipiente en cualquiera de las variantes se mantiene un tubo con indicador de CO_2 . Está constituido por una solución de bicarbonato sódico a 0.1% con unas gotas de azul de bromotimol al 0.5% hasta tener una coloración azul en atmósfera normal.

Para el cambio de color se necesita una hora hasta el verde. La incubación es a 37°C durante 10 días.

El material original (muestras) se conservan en congelación hasta que concluya el caso.

Los frotis para la observación (Brucelosis) microscópica se secan a ambiente durante 10-15 minutos, fijar levemente al calor de la llama utilizando los colorantes fuschina LPU o safranina.

a) Coloración de Stamp: Se utiliza la fuchina LPU, durante 10 minutos, lavar con agua corriente; decolorar con solución de ácido acético al 0.5% ó ácido sulfúrico al 0.05% durante 10 a 20 segundos.

Lavar con agua corriente y cubrir la preparación con azul de metileno al 1% durante 10 segundos lavar y secar para su observación.

b) Coloración de Koster: cubrir la preparación con solución de safranina LPU por un 1 minuto, lavar con agua corriente, decolorar con solución de ácido sulfúrico al 0.1% durante 10 a 20 segundos lavar y cubrir la superficie con solución fenolada de azul de metileno al 1% durante 5 segundos, lavar, secar y observar al microscopio.

Al microscopio aparecen cocobacilos teñidos de rojo, con la coloración de Stap y Koster. Con la coloración Gram se observan cocobacilos Gram(-).

Prueba biológica

Su objetivo es reproducir la enfermedad en cobayos, para esto se seleccionan 2 cobayos con más de 350g. de peso, se inocula 0.5ml. del sobrenadante homogenizado (macerado de órganos, placenta, secreción o leche en SSF) por vía subcutánea.

Observación macroscópica:

Las colonias en Agar Triptosa Sangre, se observan entre 3-10 días siendo convexas, translúcidas de bordes redondeados y lisos.

Observación microscópica

Utilizando las mismas técnicas de tinción se observan cocobacilos teñidos de rojo.

Tipificación de Brucella:

Mediante un conjunto de pruebas bioquímicas de cultivo, serológico permite identificar los biotipos de cada especie del *G. brucella*.

1. Tipificación del cultivo: Se especifica si creció en microaerofilia o en aerobiosis. Se prepara además una suspensión del cultivo en SSF de 2×10^9 células y se compara con un patrón de turbidez Brow 2°C.

2. Crecimiento en presencia de colorantes: Sembrar por estría en dos placas en 3 diluciones diferentes de tionina (1/25,000; 1/50,000, 1/100,000) y además en 2 placas con 2 diluciones diferentes de fuchina (1/50,000, 1/100,000). Incubar en 2 ambientes y comparar con la Tabla de Caracteres Diferenciales de la especie.

3. Producción de hidrogeno sulfurado: Sembrar con asa en tubo con Agar Dextrosa y situar en el borde del tubo un papel impregnado de acetato de plomo, incubar 37°C, se observará ennegrecimiento del papel cuando se desprenda hidrogeno sulfurado.

4. Prueba de la ureasa: En un medio de Christensen sembrar; incubar en ambiente observar el tubo cada 1 hora durante 5 horas y después a las 24 horas. El medio tomara una coloración rosa purpúrea inmediatamente o puede demorar varias horas.

Método rápido para la ureasa: Añadir 0.2 ml. de SSF. Suspensión bacteriana (1 asa) en un tubo pequeño, añadirle fragmentos de papel impregnado en solución de urea. Se observa una coloración rosa púrpura de inmediato.

5. También se realizan pruebas serológicas como:

- Reacción de aglutinación
- Reacción RFC
- 2 mercapto-etanol modificado por Haydu y colaboradores
- Prueba de Crwombs
- Técnica de Rivanol modificado por Haydu y colaboradores.
- Reacción con Ag amortiguado
- Prueba del anillo de la leche

Prueba biológica

Después de observar los cobayos inoculados durante 42 días, a las tres semanas extraer sangre y hacer una aglutinación lenta, a las 6 semanas repetir con el otro cobayo, si da positivo serológicamente, se procede a la siembra de los órganos, si da un resultado negativo, se realiza la necropsia.

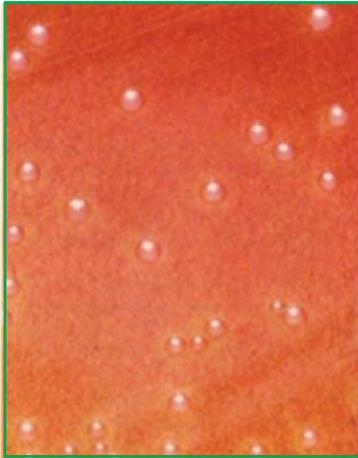
Práctica de Laboratorio No. 14

Título: Diagnóstico del género *Pasteurella*

Introducción

Es una enfermedad reconocida en lo bovinos como infecto contagiosa, de elevada letalidad, con un curso clínico agudo y signos respiratorios provocados por una neumonía, son susceptibles además otras especies.

Enfermedad: Pasteurelosis



Agente etiológico: *Pasteurella multocida*.

Animales susceptibles

Vacunos: Produce septicemia hemorrágica epizootica y es uno de los agentes secundarios del “complejo de fiebre de embarque”.

Aves de corral: Causa cólera aviar ó rayo epizootia de alta morbilidad y letalidad.

Cerdos: Causa neumonía y además actúa como agente secundario de la neumonía enzootica “porcina”.

Ovejas. Causa neumonía, mastitis, y encefalitis.

Equinos: Actúa como agente secundario de la pleuroneumonía contagiosa.

Conejos: Actúa como uno de los agentes de la “moquita”, afectando vías respiratorias, produce septicemia y abscesos subcutáneos.

Hombre: Produce neumonía, pleuresía. pericarditis, peritonitis, apendicitis, y empiemia.

Patogenia

La bacteria produce una exotoxina, así también la autólisis de la bacteria libera una endotoxina.

Siendo patógena varía en su virulencia, causando enfermedades fulminantes de curso agudo hasta de curso clínico leve ó subclínico, producido por el agente del mismo serotipo.

Estructura antigénica

Posee:

- antígeno somático de grupo (glucolípidos)
- antígeno inmunoespecífico (polisacárido) ligado a la cápsula

De acuerdo a la cápsula, la *P. multocida* se ha dividido en 4 grupos serológicos: A,B,C,D, utilizando la hemoaglutinación para su clasificación.

Existe cierta especificidad entre las cepas y las especies susceptibles.

- Cepa tipo A, abunda en las aves causando el cólera en esta especie.
- Cepa tipo B, está en bovinos y búfalos en las regiones tropicales.
- Cepa tipo C, se encuentra en perros y gatos
- Cepa tipo D, no tiene especificidad definida

Muestras

- Sangre de los procesos septicémicos.
- Contenido de los abscesos
- Exudados nasales
- Vísceras (pulmones, bazo, etc)

Materiales

- Portaobjetos
- Reactivos y colorantes de Giemsa.
- Tubo con Caldo Nutriente con suero al 10%
- Placas con Agar Sangre.
- Asa y aguja bacteriológica
- Microscópio óptico de campo claro.
- Aceite de inmersión
- Incubadora.
- Mechero Bunsen
- Medios y reactivos para La Prueba de Indol.
- Tubos con gelatina
- Tubos con urea
- Tubos con Agar hierro de Kligler
- Tubos con sacarosa
- Tubos con medios de leche tornasolada.
- Placas de Agar MacConkey.

Examen directo

Las muestras de sangre se extienden con un portaobjeto, sobre otro portaobjeto, después fijar con alcohol metílico, durante 5 minutos, colorear con Giemsa durante 30-45 minutos.

Se observan bacilos rojos bipolares.

En muestras de exudados, pus, abscesos etc, se extienden sobre un portaobjeto y se tiñen con Gram y se observa al microscopio bacilos ovoides muy pequeños (cocobacilos) Gram (-).

Cultivo

Se siembra la muestra en Caldo Nutriente con suero sanguíneo al 10% y además se aísla en placas de Agar Sangre

Incubar a 37 grados C. durante 24 horas

Observación macroscópica

En los tubos con caldo nutriente, se observa un crecimiento uniforme.

En las placas de Agar Sangre las colonias son grisáceas amarillentas, sin hemólisis.

Observación microscópica

Realizado el frotis , se observan bacilos cortos Gram (-)

Pruebas Bioquímicas

Pasada la incubación a 37 grados durante 24 horas, se obtiene:

- Indol (+)

- Gelatina (-)
- Urea (-)
- Agar hierro de Kliguer, glucosa (+) amarillo en la parte inferior de la cuñas, lactosa (-) rojo en la superficie del medio.
- sacarosa (+), produce acido.
- leche tornasolada (-), no la coagula.
- Agar MacConkey (-)

Serotipificación

Mediante técnicas de aglutinación se identifican antígenos somáticos y capsulares.

Práctica de Laboratorio No. 15

Título: Diagnóstico del género Mycoplasma

Objetivos:

- a. Aprender el procedimiento para el muestro, aislamiento e identificación del agente etiológico
- b. Conocer las características macroscópicas y microscópicas del agente etiológico.

Introducción:

Sus características principales es la ausencia de pared celular, las colonias son parecidas a “huevo frito”, con filtrabilidad a través de membranas de 450um.

Para la identificación de la especie se incluyen características culturales, bioquímica y antigénicas.



Enfermedad: Mycoplasmosis

Animales susceptibles y enfermedades que origina

Bovinos: Causa la pleuroneumonía contagiosa bovina originado por *Mycoplasma mycoides* variedad mycoides.

Terneros: Causa neumonía originado por *Mycoplasma bovis*.

Cabras: Causa la pleuroneumonía contagiosa originada por *Mycoplasma mycoides* variedad capri.

Cabras y ovejas: Causa el *Mycoplasma agalactiae* la agalactia contagiosa.

Aves: Causa la enfermedad crónica respiratoria (CRD) originada por *Mycoplasma gallisepticum*. También aerosaculitis (inflamación de los sacos aéreos) originado por *Mycoplasma meleagridis* en pavos, y sinovitis (pollo y pavo) originado por *Mycoplasma synoviae*.

Cerdos: Causa la neumonía enzoótica porcina originada por *M. hyopneumoniae*.

Muestras:

- De los pulmones se toman lesiones típicas en los lóbulos apicales y en la tráquea.
- Aves muertas por lesiones en sacos aéreos
- Contenido articular
- Exudados nasales
- Exudados vaginales
- Semen y leche

Las lesiones anatomopatológicas, la clínica y epizootiología de la enfermedad indican el tipo de muestra a seleccionar y enviar.

Examen directo:

Las muestras de órganos se maceran en arena estéril y PBS (pH = 7.4), se centrifuga a 1500rpm/10 minutos y se toma del sobrenadante 0.2ml.

Cultivo:

- Sembrar por estría en placas con medio de DPB(modificado)
- Sembrar en tubo con caldo DPB con acetato de talio 1/4000 y penicilina 100UI/ml, incubar a 37°C en condiciones de microaerofilia

Materiales:

- Portaobjeto
- Medio DPB, placas y tubos de ensayo
- Centrífuga
- Morteros y mangos
- Arena estéril
- Lana de microaerofilia
- Pipetas de 1ml.
- Microscopio óptico de campo claro
- Colorantes de Gram
- Alcohol metílico
- Medio PBS
- Mechero
- Incubadora aerobia
- Asas bacteriológicas
- Microscopio estereoscopio
- Discos con caldo glucosado al 1.5%
- Tubos con caldo arginina
- Tubos con caldo urea
- Placas con medio tetrazoluim
- Sueros de las diferentes especies de Mycoplasmas para realizar serotipificación
- Discos impregnados con 0.02ml. de los diferentes sueros para la prueba de inhibición del crecimiento
- Incubadora anaerobia con balón de CO₂.

Examen microscópico

Del sobrenadante realizar un frotis y teñir con Giemsa donde se observan microorganismos pleomórficos o corpúsculos cocoides de 0.1-0.4 micras.

Observación macroscópica:

Con el estereoscopio y un microscopio de campo claro se observan las colonias típicas de forma de “huevo frito” y con un diámetro de 10 -600 micras.

Después se cortan las colonias formando un bloque con la aguja y con asa bacteriológica se transplanta a otra placa con medio DPB frotando el bloque sobre la superficie del medio de cultivo.

- Se realiza también en medio de DPB sin inhibidores durante cinco pases para conocer si mantienen su forma de la colonia típica. Si mantiene su forma se está en presencia de *Mycoplasma spp.* o de *Acholeplasma spp.*; con esto se descarta a las “Forma L”.

- Después para diferenciar los *Mycoplasmas* de *Acholeplasma* se extiende una colonia de Mycoplasma sobre el medio de DPB y sobre la estría se sitúa un disco de digitonina al 1.5% (parecido a un antibiograma). Incubar a 37°C en microaerofilia y se observa entre 2 y 7 días.

- Se crece es un **Acholeplasma**

Si no crece, se observa un halo inhibitor y es un **Mycoplasma**

La observación macroscópica en tubos con DPB muestra una turbidez casi imperceptible al comparar con un tubo con DPB sin inocular; si se ve turbidez indica contaminación lo cual requiere volver a sembrar a partir de una colonia aislada con Agar DPB

Pruebas Bioquímicas:

Se realizan en tubos con caldo de DPB con suero de caballo al 10% a partir del cultivo puro.

a. Acidificación de la glucosa: Se siembra el cultivo puro con asa bacteriológica en caldo con glucosa, incubación aeróbica de 2-7 días a 37°C, empleando rojo fenol como indicador. Si da cambio a amarillo (+) y si es rojo es (-).

b. hidrolisis de la arginina: Se procede de igual a la anterior siendo la de color rosado (-) y con rojo intenso en (+).

c. Producción de ureasa: Se emplea medio de urea, se procede igual, los que se ponen rojo (utilizan la urea) y son (+) y se identifican como ***Ureoplasma*** cuando no adquiere esa coloración es (-) entonces son ***Mycoplasma***.

d. Reducción del tetrazolium: Se realiza en medios sólidos en placas y se siembran por estrías se incuba en aerobiosis y otro en anaerobiosis estricto a 37°C durante 2-3 días. Es (+) cuando crecen colonias rosadas. Hay una tabla de ***Mycoplasma*** para su diferenciación por especies.

e. En la observación macroscópica de la colonia aparece la formación de película y punto en su crecimiento. la película se debe aun enjambramiento debido al acumulo de lípidos alrededor de las colonias y el punto es un oscurecimiento de la colonia siendo por lo general de color negro.

Pruebas serológicas:

Se realiza la serotipificación de las cepas enfrentándolas a los sueros hiperinmunes de las diferentes especies de ***Mycoplasmas*** dando en los casos (+) la formación de grumos por aglutinación.

Se realiza la técnica de Inhibición del Crecimiento; a partir del cultivo en caldo se hacen diluciones sucesivas (10^{-5} , 10^{-4} , etc.), después de cada dilución se toma una gota (0.01 ml) y se sitúa de forma corrida en una placa con DPB, se deja secar a temperatura ambiente. Sobre las estrías se ponen discos de papel de filtro que tienen 0.02 ml de suero hiperinmunes de cada una de las especies de **Mycoplasma**.

Se incuba a 37°C y se observa a las 48 horas. Son positivas cuando aparece un halo de inhibición del crecimiento de 1 mm de diámetro en adelante, lo cual se observa en la placa con el microscopio o de un estereoscopio.

El halo de inhibición se debe a la reacción homóloga del cultivo con su antisuero lo que inhibe su crecimiento formando el halo de inhibición.

Práctica de Laboratorio No. 16

Título: Diagnóstico del género *Rickettsia*

Objetivo:

- ✓ Saber realizar las principales tomas de muestras.
- ✓ Saber hacer el método de diagnóstico de la anaplasmosis
- ✓ Observar las características microscópicas en las extensiones de sangre

Agente etiológico: *Anaplasma marginale*

Enfermedad: *Anaplasmosis bovina*, anemia infecciosa bovina, bobera de los terneros.

Introducción:

Es una enfermedad infecciosa y transmisible que afecta a los bovinos, puede ser de curso agudo o crónico, se caracteriza clínicamente por fiebre alta, anemia progresiva, postración y relacionada con la presencia de corpúsculos intraeritrocítico nombrado *Anaplasma marginale*, caracterizado y situado en la periferia dentro del eritrocito.

Los *Anaplasmas* son células protocarioóticas con vida parasitaria intracelular obligada, posee además ADN y ARN y posee una actividad metabólica propia incompleta.

Hay dos especies dentro del género:

- *Anaplasma marginale*; afecta los bovinos.
- *Anaplasma ovis*; afecta a ovinos y caprinos.

La especie marginales se divide en dos subespecies

- Anaplasma marginales subespecie marginales
- Anaplasma marginales subespecie centrale

Patogenia:

La anemia es producida por la inhibición de los órganos hematopoyéticos debido a las fracciones tóxicas del anaplasma y por su distribución globular en el bazo al ser sensibilizados los eritrocitos.

La transmisión se realiza principalmente a través de la garrapatas aunque existen otras vías. Para el diagnóstico es necesario conocer la fase clínica de la enfermedad.

Muestras

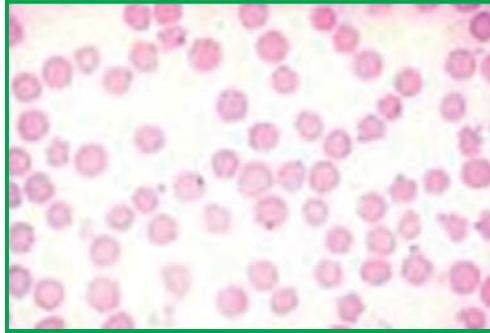
1. En animales vivos: Con los síntomas clínicos ya señalados, el animal afectado por anaplasmosis se debe realizar frotis sanguíneos delgados, los cuales deben colorearse con Giemsa para evidenciar el agente causal. Sangre completa, con anticoagulante y refrigerada, es la muestra de elección para enviar al laboratorio.
2. En animales recién muertos: Se debe realizar toma de muestra de sangre en la oreja, cola, corazón o extremidades. Adicionalmente, se deben hacer frotis de riñón, bazo e hígado. Las muestras a enviar al laboratorio deben estar refrigerada

Diagnóstico

En los casos agudos se realiza:

- a) Los diagnósticos clínicos
- b) Los diagnósticos hematológicos

c) Los diagnósticos microscópicos



En los casos crónicos:

d) El diagnóstico serológico: Aglutinación RFC (permite detectar portadores asintomáticos)

a) Diagnóstico clínico:

En la fase aguda se observa fiebre y anemia intensa, anorexia, alteración de la frecuencia del pulso, y de la respiración, constipación alternada con diarrea, no tiene producción láctea.

En la fase crónica no se observa sintomatología típica, pueden aparecer complicaciones neumónicas.

b) Diagnóstico hematológico

1. Lo hematíes circulante descienden de un 50- 80% de la totalidad.
2. La hemoglobina desciende de forma significativa. Los parámetros hematológicos normales por especie han de tenerse presente para el diagnóstico.

c) Diagnóstico microscopico

Utilizando la tinción de Giemsa permite comprobar la presencia de Anaplasma en los eritrocitos.

Se toma la muestra de sangre de la vena yugular con el anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminico tetracético) en cantidad de 5mg/5ml de sangre)

La muestra se puede tomar a través de la punción de la vena marginal de la oreja y hacer extensión directa sobre la superficie de un portaobjetos.

Materiales:

- Refrigerador
- Incubadora
- Centrifuga
- Tubos serológicos
- Gradillas para las muestras y para las pruebas
- Pipetas
- Reactivos de ClNa y fenol
- Antígenos para la prueba lenta
- Baño de María
- Centrifuga
- Balanza
- Solución Barbitol
- Solución alcerver
- Conservantes para complemento
- Productos biológicos (hemolisinas, complemento, antígeno de Anaplasma y sueros referentes + y -)

d. Diagnóstico serológico:

Se extraen 5ml. de la vena yugular en un tubo serológico y se deja coagular para utilizar el suero.

Examen directo:

Diagnóstico microscópico

Depositar una gota de sangre en portaobjeto, extender, dejar secar al aire, fijar

con alcohol metílico y teñir con colorante Giemsa LPU.

Diagnóstico serológico

A partir del suero de la sangre coagulada, permite además detectar portadores asintomáticos.

Observación microscópica

Utilizando un microscopio óptico compuesto de campo claro con una gota de aceite de inmersión.

Los casos positivos de *Anaplasma marginales* subespecie *marginale* se ven estructuras esféricas u óvalos de 0.3-1micras. de diámetro situado en los hematíes cerca del borde.

El *Anaplasma marginales* subespecie *centrale* difiere del anterior por ser ligeramente mayor, situándose el parásito centralmente en más del 90% de las células.

Observación del diagnóstico serológico:

En los animales jóvenes pueden aparecer títulos por transferencia de la madre en el calostro.

A partir de los 6 meses no debe existir casos positivos por este concepto y de tener título se considera de importancia a los efectos del diagnóstico.

Se utiliza las pruebas serológicas:

1. Aglutinación lenta en tubos .
2. Reacción de Fijación del Complemento (RFC)

BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Acha PN., Szyfres B. (2003): Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera Edición Volumen 1. Bacteriosis y Micosis Publicación Científica No. 580 OPS pp. 175-184
- 📖 CENPALAB. (2000): Método ELISA para la detección de anticuerpos de *Leptospira* spp en perros y primates humanos. Proyecto Organizativo de Trabajo (POT) 00.03.01.025
- 📖 Colectivo de Autores Prácticas de Laboratorio de Microbiología Veterinaria ISCAH MES. 1998
- 📖 Duarte C. (2004): Experiencia Cubana en el Diagnóstico Bacteriológico de la Leptospirosis en Animales. Zoonosis bacterianas de impacto para los países de América Latina. Seminario-Taller. p-30
- 📖 Feraud, D. (2006) Comunicación Personal. Facultad de Medicina Veterinaria UNAH. Cuba
- 📖 García, R.L.; Lugo, S.; Abeledo, M.A.; Machado, H. y Feraud, D (2008) Evaluación de un ELISA indirecto utilizando antígeno de *Leptospira biflexa* para la comprobación del efecto vacunal en caninos criados en condiciones controladas. Resumen Anuario Universidad Agraria de La Habana UNAH
- 📖 International Leptospira Society. OMS. (2003) Human leptospirosis. Guidance for diagnosis. Surveillance and control (2003)
- 📖 Levett, P.N. (2001) Leptospirosis. Clin Microbiol Rev, Vol.14, Nº 2, p.296-326.
- 📖 Lugo L., Riera A., Otaño Z., Zamora A. (2007): Ensayo ELISA para la detección de anticuerpos *Bordetella bronchiseptica* en animales de laboratorio. II Encuentro de Diagnosticadotes. VI Congreso Internacional de Medicina Veterinaria. La Habana Cuba. ISBN 978-959-82-047-3.

- 📖 Merck (2000): Manual de Veterinaria, Ed. 5ta Ed., Barcelona España. Ed. Océano Pacífico p 532-533
- 📖 Norma Ramal. Leptospirosis. (1994) Diagnóstico de Laboratorio. Rectificación. NRAG-673.
- 📖 OIE (2006) Manual of standards for diagnostic test and vaccines Paris, p186-190
- 📖 Planas, A. (1979) Microbiología I. Tomo I. Microbiología General Veterinaria. ISCAH. Cuba
- 📖 Planas, A. (1979) Texto básico de Microbiología II. Tomo I. Microbiología Especial Veterinaria. ISCAH. Cuba
- 📖 Tepstra J., Hortskeerl R., Smith L., Korver H. (1998): International course in Laboratory Techniques for the diagnostic of leptospirosis. Incidencia Tres Ríos. Costa Rica.



**“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”**

**- Ing. Radamés L. García A. MSc.
Profesor de Microbiología e Inmunología
Universidad Nacional Agraria de la Habana, Cuba**

ISBN 978-99924-1-026-4



9 789992 410264