

L-Manuals T-III

Manual Básico de Prácticas para Análisis Clínicos

Rafael Martín, MURRAY-NÚÑEZ

María Guadalupe, OROZCO-BENÍTEZ

Autores

María Isabel, VILLARREAL-GONZÁLEZ

Colaboradora

ECORFAN[®]

Manual Básico de Prácticas para Análisis Clínicos

Primera Edición

Rafael Martín, MURRAY-NÚÑEZ
María Guadalupe, OROZCO-BENÍTEZ

Universidad Autónoma de Nayarit

ECORFAN-México

Manual Básico de Prácticas para Análisis Clínicos

Autores

MURRAY-NÚÑEZ, Rafael Martín
OROZCO BENÍTEZ, María Guadalupe

Colaboradora

VILLARREAL-GONZÁLEZ, María Isabel

Diseñador de Edición

SORIANO-VELASCO, Jesús. BsC.

Producción Tipográfica

TREJO-RAMOS, Iván. BsC.

Producción WEB

ESCAMILLA-BOUCHAN, Imelda. PhD.

Producción Digital

LUNA-SOTO, Vladimir. PhD.

Área de Conocimiento

Área de Ciencias Biológico, Agropecuarias y
Pesqueras

Unidad Académica

Medicina Veterinaria y Zootecnia

Academia

Análisis clínicos

Editora en Jefe

RAMOS-ESCMILLA, María. PhD

Ninguna parte de este escrito amparado por la Ley de Derechos de Autor, podrá ser reproducida, transmitida o utilizada en cualquier forma o medio, ya sea gráfico, electrónico o mecánico, incluyendo, pero sin limitarse a lo siguiente: Citas en artículos y comentarios bibliográficos, de compilación de datos periodísticos radiofónicos o electrónicos. Visite nuestro sitio WEB en: www.ecorfan.org

ISBN: 978-607-8534-13-5

Sello Editorial ECORFAN: 607-8534

Número de Control LM: 2017-03

Clasificación LM (2017):060616-0103

A los efectos de los artículos 13, 162 163 fracción I, 164 fracción I, 168, 169,209, y otra fracción aplicable III de la Ley del Derecho de Autor



® Universidad Autónoma de Nayarit

Ciudad de la Cultura Amado Nervo.
Boulevard Tepic-Xalisco S/N C.P. 63190
Tepic, Nayarit. México.

Contenido

Presentación	1
Introducción	2
Normas referentes al orden	6
Normas referentes a la utilización de productos químicos y medios de cultivo.	6
Práctica 1 Tinciones basicas (Gram y Ziehl Neelsen)	7
Práctica 2 Inoculación de medios de cultivo en placa y observación de morfología colonial	15
Práctica 3 Examen general de orina	22
Práctica 4 Biometría Hemática	38
Práctica 5 Aislamiento y cuantificación de microorganismos a partir de muestras ambientales (agua)	61
Práctica 6 Examen de piel	65
Referencias	70
Apéndice A. Consejo Editor Universidad Autónoma de Nayarit	72
Apéndice B. Consejo Editor ECORFAN	73

Presentación

El " Manual Básico de Prácticas para Análisis Clínicos" está diseñado como material didáctico de laboratorio para estudiantes que cursan la unidad de aprendizaje de Laboratorio Clínico, que forma parte del plan de estudios de la Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista, de la Universidad Autónoma de Nayarit.

Es importante que los alumnos tengan las técnicas de laboratorio que expliquen de manera sencilla el procedimiento de las prácticas con la finalidad de realizar un trabajo seguro y eficiente.

Las prácticas desarrolladas son muy sencillas pero son el punto de partida para otros estudios clínicos más complejos y especializados, que permitan llegar a un diagnóstico definitivo en la muestra analizada.

Al realizar estas prácticas el alumno adquirirá las habilidades necesarias para el manejo, preparación, realización e interpretación de los resultados obtenidos en las diferentes prácticas. El alumno debe trabajar en equipo, ser responsable, respetuoso y tener disciplina en el laboratorio así como respetar las medidas de seguridad que están especificadas en las NOM.

.

.

Introducción

El Laboratorio Clínico es el espacio físico donde se efectúan una gran diversidad de procedimientos médicos, científicos, técnicos, etc., que en conjunto representan un valioso recurso de la clínica al documentar el estado de salud (Medicina Preventiva) o de enfermedad (Medicina Curativa). Existe una única razón por la que el médico veterinario envía la muestra al laboratorio, y esta es que necesita información para tomar decisiones adecuadas; ya que el clínico solo observa en el paciente una serie de manifestaciones clínicas, como signos, síntomas y/o síndromes, que no puede cuantificar por lo que deben ser traducidos a datos concretos (Terres 2009).

En los últimos años ha venido creciendo el uso del Laboratorio Clínico, como una herramienta de diagnóstico como auxilio al clínico. La correlación de los resultados de laboratorio, junto con los del historial clínico del paciente permiten al clínico llegar a un diagnóstico más acertado, y tomar en cuenta las diferentes variables, para adoptar la mejor terapia de respuesta a lo que afecta a nuestro paciente (Messeguer *et al.* 1992). Es un hecho perfectamente constatado, que en los momentos actuales, el clínico no puede, o cuando menos no debe, prescindir del laboratorio. Si bien es cierto que una anamnesis bien hecha facilita mucho las cosas a la hora de emitir un diagnóstico y que el llamado “Ojo Clínico”, permite a algunos diagnosticar un proceso tras una somera exploración, el uso del laboratorio permite ratificar, o en su caso rectificar, ese diagnóstico que, tras exhaustiva exploración, el clínico había intuido., el no tener en cuenta esa fuente tan importante de información que suponen los análisis clínicos (Messeguer *et al.* 1992).

Dentro de las principales indicaciones para la realización de exámenes de laboratorio se destacan: 1) la confirmación de la presencia o de la causa de una enfermedad, 2) la determinación de un pronóstico más exacto, 3) la evaluación de las alteraciones funcionales de algún sistema orgánico, 4) la evaluación de la respuesta al tratamiento, 5) el monitoreo del progreso de una enfermedad, 6) la evaluación del estado inmunológico de un animal o de un hato (Jardon *et al.* 2003).

Las limitaciones más serias a la completa utilización de los datos de laboratorio están en la fase de interpretación y es esencial reconocer que tales datos solo adquieren significación cuando son interpretados correctamente por el clínico y el patólogo. Es por ello que para la interpretación de los resultados se debe estar siempre atento a la especie animal examinada teniendo en vista las distintas particularidades dentro de estas, desde la respuesta sistémica frente a las diferentes enfermedades, hasta los valores fisiológicos de referencia, considerados “normales” para cada especie (Medway *et al.* 1973).

El Diagnóstico de Laboratorio puede y debe ejercer su papel como herramienta de diagnóstico para el clínico, entre tantos se debe siempre tener en mente que los exámenes complementarios deben ser solicitados después de un exhaustivo examen clínico del paciente y la formulación de las posibles hipótesis diagnósticas (Jardon *et al.* 2003). La falta de instrumentos para el diagnóstico será frecuentemente la barrera entre lo preciso y lo intuitivo, aunque también hay que considerar que el laboratorio no tiene que ser una panacea, se debe emplear cuando se requiera, cuando esté indicado, (Bush 1999).

El Laboratorio Clínico es el espacio físico donde se efectúan una gran diversidad de procedimientos médicos, científicos, técnicos, etc., que en conjunto representan un valioso recurso de la clínica al documentar el estado de salud (Medicina Preventiva) o de enfermedad (Medicina Curativa). Existe una única razón por la que el médico veterinario envía la muestra al laboratorio, y esta es que necesita información para tomar decisiones adecuadas; ya que el clínico solo observa en el paciente una serie de manifestaciones clínicas, como signos, síntomas y/o síndromes, que no puede cuantificar por lo que deben ser traducidos a datos concretos (Terres 2009).

Los diversos Laboratorios Clínicos, se pueden clasificar en:

Laboratorios de Referencia: laboratorio de reconocido nivel de capacitación científica y diagnóstica en lo que concierne a una determinada enfermedad o enfermedades animales y/o a metodología de pruebas; incluye la capacidad para describir y evaluar los reactivos, entre otros.

Laboratorio Dependiente: aquel que desde el punto de vista institucional, patrimonial administrativo, laboral, técnico, científico, presupuestal y financiero; constituye una unidad integral con la institución o empresa a la cual pertenece.

Laboratorio Privado: aquel que ostenta patrimonio propio e independiente, autonomía administrativa, presupuestal y financiera; cuenta con una dirección y orientación autónoma, y que presta sus servicios al público en general, a la institución o empresa que lo solicite.

Laboratorio Registrado: toda persona natural o jurídica con domicilio en el país, que ejerce la actividad de diagnóstico veterinario o con fines de investigación zoonosológica. La función primordial del Laboratorio Clínico, es la de “efectuar determinaciones analíticas cualitativas y cuantitativas de líquidos orgánicos, como: sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.; así como heces y otras sustancias”. Con objetivos específicos de: Detectar enfermedades asintomáticas, Confirmar el diagnóstico, Establecer el pronóstico, Evaluar el tratamiento, Proporcionar información estadística epidemiológica, Detección, manejo y control de problemas de salud pública, entre otros. Los laboratorios de análisis clínicos, de acuerdo a sus funciones, se pueden dividir en: a. Laboratorios de Rutina o de Seguimiento: comprenden 5 departamentos básicos, como son; Hematología, Química Clínica, Inmunología, Microbiología Diagnóstica y Parasitología Clínica.

Buenas prácticas de laboratorio. Las Buenas Prácticas de Laboratorio se definen como el conjunto de reglas, procedimientos operacionales, prácticas establecidas y promulgadas por determinadas organizaciones; consideradas de obligatorio cumplimiento para asegurar la calidad e integridad de los datos producidos en determinados procesos de laboratorio, con el fin de armonizar protocolos, información y documentación de los Procedimientos Operativos Estandarizados. Es de primordial importancia que todos los profesionales de Laboratorio conozcan:

El equipamiento del laboratorio

- La metodología de trabajo del laboratorio
- Los agentes, sustancias y productos peligrosos que existen en el laboratorio.
- Las medidas a tomar en caso de emergencia.

El Laboratorio debe seguir prácticas generales de seguridad basadas en la **Normas Oficiales Mexicanas** de las cuales se han seleccionado algunas que determinan su buen funcionamiento y se describen a continuación.

Tabla 1.1 Normas Oficiales Mexicanas

Especificaciones	Normas Oficiales Mexicanas
Condiciones del medio ambiente	
El laboratorio cuenta con las condiciones y niveles de iluminaciones suficientes y adecuadas para el tipo de actividad que realiza.	NOM-025-STPS-1999
Se cuenta con normas de Seguridad e Higiene que permitan reducir el riesgo de accidentes en el área de trabajo.	NOM-017-STP-2001
Se prohíbe en zonas controladas el consumo de alimentos, bebidas y tabaco, el uso de cosméticos y sustancias para ser aplicadas en la piel, así como el empleo de pañuelos que no sean desechables.	NOM-087-ECOL-1995
Sistema contra incendios	
Se instalarán equipos contra incendio de acuerdo al grado de riesgo de incendio, a la clase de fuego que se pueda presentar en el laboratorio y a la cantidad de materiales en el almacén y proceso.	NOM-002-STPS-2000
La puertas de salida normales de las rutas de evacuación y de las salidas de emergencia, deberán ser libres de obstáculos, candados, picaportes o cerraduras con seguros puestos durante las horas laborales	NOM-002-STPS-2000
Los extintores deben ser revisados al momento de su instalación y, posteriormente, a intervalos no mayores de un mes.	NOM-002-STPS-2000
Equipos de protección	
Equipo de personal, selección, uso y manejo en los centros de trabajo	NOM-017-STPS-2001
Sistema para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo	NOM-018-STPS-2000

Propósito específico de la práctica

Al realizar estas prácticas adquirirás las habilidades necesarias para el manejo, preparación, realización e interpretación de los resultados obtenidos en las diferentes prácticas básicas de laboratorio clínico, que te permitirán llegar a un diagnóstico definitivo.

Criterios de desempeño específico de la práctica

El alumno será capaz de aplicar los conocimientos teóricos y prácticos de la unidad de aprendizaje de “Laboratorio clínico” con la finalidad de que pueda identificar, diagnosticar y solucionar un problema del entorno.

Resultados esperados en relación a los criterios de desempeño específico de la práctica

Deberás hacer una interpretación personal sobre la metodología empleada en forma de reporte donde describas cada paso en la preparación y análisis de una muestra problema. Los resultados obtenidos de la práctica te servirán para hacer un diagnóstico del problema abordado, el cual será confirmado con la realización de prácticas posteriores. El éxito final de la práctica será evidenciado cuando muestres la habilidad para escribir un reporte, el cual deberás entregarlo una semana después de haber realizado la práctica.

Reglamento del laboratorio aplicable a los alumnos

1. Deben ser puntuales a la entrada al laboratorio, teniendo 15 minutos de tolerancia y si llegaran más tarde perderán el derecho a la práctica.
2. Deben usar bata durante el desarrollo de la práctica, de lo contrario perderán el derecho a ésta.
3. Durante el desarrollo de la práctica deben permanecer en el laboratorio y podrán salir de este únicamente con el permiso del docente o del técnico académico.
4. Durante el desarrollo de la práctica deberán mantener el orden en el laboratorio, de lo contrario podrán ser expulsados.
5. Para realizar una práctica, los alumnos deberán haber leído y comprendido previamente la técnica o procedimiento correspondiente con su respectivo fundamento.
6. Al concluir el desarrollo de una práctica cada alumno deberá elaborar un reporte, el cual será evaluado por el encargado del laboratorio o por el facilitador de la unidad de aprendizaje correspondiente.
7. Los alumnos no deben consumir alimentos ni fumar dentro del laboratorio, de lo contrario pueden ser llamados de atención o expulsados.
8. El material destruido por parte de los alumnos se deberá reponer en un lapso no mayor de quince días después que fue realizada la práctica, de lo contrario pagaran la equivalencia.
9. Al faltar a una sesión de práctica, el alumno perderá automáticamente el derecho a ésta.
10. Los alumnos deberán solicitar el material necesario para realizar la práctica, mismo que será lavado con agua y jabón y enjuagado con agua destilada. Además, los alumnos deberán entregar y guardar el material seco en su lugar correspondiente.
11. El equipo utilizado por alumnos deberá entregarse en las condiciones como fue recibido antes del inicio de la práctica y si se encuentra alguna anomalía, deberá ser reportado al encargado del laboratorio.
12. El área de trabajo deberá dejarse libre de material y limpia una vez que fue terminada la práctica.

Normas específicas de la práctica.

Normas personales

1. Cada grupo se responsabilizará de su zona de trabajo y de su material.
2. La utilización de bata es muy conveniente, ya que evita que posibles proyecciones de sustancias químicas lleguen a la piel.
3. Es muy aconsejable, si se tiene el pelo largo, llevarlo recogido usar cofia.

4. No usar anillos, pulseras, aretes largos en el desarrollo de la práctica.
5. Las uñas deben de ser cortas y sin esmalte.
6. En el laboratorio prohibido fumar
7. No consumir alimentos.
8. Uso de guantes desechables (cuando lo indique la práctica).
9. Durante el sembrado, cada alumno deberá utilizar cubreboca.

Normas referentes al orden

1. Las sustancias tóxicas y medios de cultivo permanecerán en un lugar específico bajo control por el personal del laboratorio.
2. Es imprescindible la limpieza del laboratorio, de su instrumental y utensilios, así como que esté ordenado.
3. En las mesas de laboratorio o en el suelo, no pueden depositarse prendas de vestir, apuntes, etc., que pueden entorpecer el trabajo.

Normas referentes a la utilización de productos químicos y medios de cultivo.

1. Antes de utilizar un determinado compuesto o cualquier medio de cultivo, asegurarse bien de que es el necesario. Para ello deberás leer, si es preciso un par de veces, el rótulo que lleva el frasco.
2. Como regla general, no coger ningún producto químico ni medio de cultivo. El profesor los proporcionará.
3. No devolver nunca a los frascos de origen los sobrantes de los productos utilizados sin consultar al profesor.
4. No tocar con las manos, y menos con la boca, los productos químicos y medios de cultivo.
5. Los productos inflamables no deben estar cerca de fuentes de calor, como estufas, hornos, etc.
6. Si se derrama sobre ti cualquier producto corrosivo o algún medio de cultivo, lávate inmediatamente con mucha agua y avisa al profesor.
7. Al preparar cualquier disolución o medio de cultivo deberá ser rotulado convenientemente.

Seguridad

Es indispensable que sigas siempre una serie de reglas, sencillas pero eficaces, para evitar la contaminación microbiana, tanto de las personas como del material y substancias empleadas, así como de los cultivos microbiológicos con los que trabajas.

Práctica 1 Tinciones basicas (Gram y Ziehl Neelsen)

El laboratorio de análisis de será el lugar donde se realice la práctica, teniendo capacidad para un máximo de 15 estudiantes, quienes podrán formar equipos de 5 estudiantes cada uno.

Introducción

Para apreciar con mayor definición la morfología y agrupación de las bacterias es necesario teñirlas con soluciones colorantes que reaccionan químicamente con las estructuras bacterianas. Los colorantes son compuestos orgánicos y pueden ser ácidos o básicos de acuerdo a su afinidad para reaccionar con compuestos celulares básicos o ácidos respectivamente. Las técnicas de tinción, se clasifican en dos tipos: simples y diferenciales.

Tinciones simples:

En una técnica de tinción simple se emplea sólo un colorante. Dependiendo de sus propiedades ácidas o básicas, éste colorante impartirá color a los microorganismos o al medio que los rodea:

1. Tinción simple positiva. Se emplea un colorante básico (catiónico) en solución acuosa o alcohólica. Por su carga positiva, el colorante se combina con las estructuras de la superficie celular y los ácidos nucleicos. Esta tinción permite apreciar la forma, disposición y tamaño relativo de las bacterias. Sin embargo, no se muestran detalles finos de su estructura interna. Los colorantes básicos utilizados con más frecuencia son la safranina, fucsina fenicada, cristal violeta y azul de metileno.
2. Tinción simple negativa. Con esta técnica se utiliza un colorante ácido, también llamado aniónico. El cual es incapaz de penetrar la célula (rojo Congo o nigrosina), por lo cual las bacterias no se tiñen. Al usar este tipo de colorante se tiñe la superficie del vidrio sobre el que se encuentran los microorganismos y se observa sólo su forma y contorno, mientras que su interior permanece transparente.

Tinciones diferenciales

Las tinciones diferenciales son procedimientos en los cuales se utiliza más de un colorante y como su nombre lo indica, permite diferenciar tipos de microorganismos, ya que no todos se tiñen del mismo modo con este procedimiento.

Tinción de Gram

Esta técnica de tinción diferencial fue desarrollada por Hans Christiam Gram. Las bacteria teñidas por medio de la tinción de Gram se clasifican en dos grupos de acuerdo a su capacidad para captar los colorantes: Bacterias Gram positivas, que retienen el cristal violeta y se tiñen de color morado. Bacterias Gram Negativas, que no retienen el cristal violeta, y por el contraste con safranina se tiñen de rojo. Se utilizan cuatro reactivos diferentes, aplicados en el siguiente orden:

1. Cristal violeta

2. Lugol
3. Mezcla de alcohol-acetona
4. safranina

En el proceso de tinción se forma un complejo cristal violeta-yodo, el cual es insoluble dentro de la célula; pero es extraído por la mezcla alcohol-acetona sólo en las bacterias Gram negativas. Esto se debe a que la pared celular de las bacterias Gram positivas se deshidrata con la mezcla alcohol-acetona, cerrando los poros de la pared y evitando la salida del complejo cristal violeta-yodo. En cambio en las bacterias Gram negativas el alcohol acetona disuelve la membrana externa y la capa de péptido glicano por ser más delgada, no impide la salida del complejo cristal violeta-yodo.

Interpretación

- Las bacterias Gram positivas se tiñen de color morado o azul
- Las bacterias Gram negativas se tiñen de color rojo

Propósito específico de la práctica

Al realizar esta práctica aprenderás a diferenciar las bacterias por su afinidad a los colorantes. Además utilizaras una de las tinciones más importantes en microbiología como es la tinción de Gram.

Desarrollo de la práctica

Objetivos:

- Conocer las diferentes técnicas de tinción para la observación de microorganismos.
- Diferenciar características morfológicas de los microorganismos por medio de su observación en el microscopio.
- Clasificar a las bacterias de acuerdo a sus características tintoriales.

Material:

- Microscopio Compuesto
- Mechero Bunsen
- Asa de nicromo
- Porta y cubreobjetos
- Aceite de inmersión

Método:

A. Frotis de bacterias

1. Colocar una gota de solución salina fisiológica en un portaobjetos limpio.
2. Esterilizar el asa de nicromo en la flama del mechero y dejarla enfriar.

3. Tomar con el asa de nicromo fría, una pequeña cantidad de la cepa bacteriana y dispersarla en la solución salina con movimientos suaves de rotación.
4. Esterilizar a la flama nuevamente el asa de nicromo.
5. Fijar el frotis con el calor de la flama del mechero, evitando un sobrecalentamiento del portaobjeto.

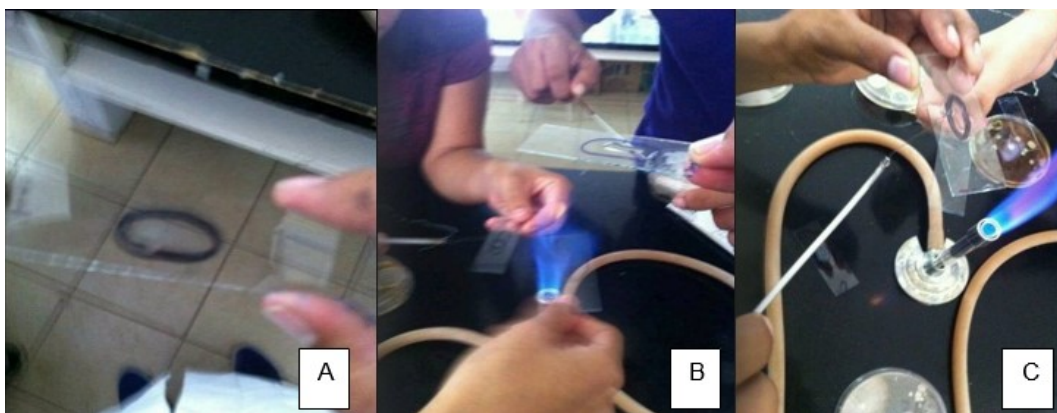
B. Tinción simple

1. Preparar un frotis de bacterias como se describió en el punto anterior.
2. Colocar el frotis preparado sobre una varilla de tinción y cubrirlo con azul de metileno, cristal violeta o safranina durante 1 minuto.
3. Eliminar el exceso de colorante lavado con agua corriente.
4. Fijar el frotis con el calor de la flama del mechero, evitando un sobrecalentamiento del portaobjeto.

C. Tinción de Gram

1. Preparar un frotis de bacterias como se describió en el punto A.
2. Cubrir el frotis con cristal violeta durante 1 minuto.
3. Lavar con agua corriente.
4. Cubrir el frotis con solución de Yodo lugol durante 30 seg,
5. Lavar con agua corriente.
6. Agregar alcohol-acetona, gota a gota, 15 seg. hasta decolorar completamente.
7. Lavar con agua corriente.
8. Cubrir el frotis con safranina durante 1 minuto.
9. Lavar con agua corriente, dejar secar y observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100X).

Figura 1.1 Preparación del Frotis para tinción de Gram



Fuente: Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil en práctica de laboratorio UAMVZ

- A. Marca un círculo con un marcador indeleble en la cara del cristal dónde no se pondrá la muestra a teñir.
- B. Coloca una gota de solución salina fisiológica en el portaobjetos marcado.

- C. Esteriliza el asa de micromo en la flama del mechero, deja enfriar el asa y toma una pequeña cantidad de la cepa bacteriana a identificar, dispérsala en la solución salina del portaobjetos con movimientos suaves de rotación, quema el exceso. y fija el frotis con el calor de la flama.

Figura 1. 2 Diagnóstico microbiológico texto y atlas a color. Koneman.

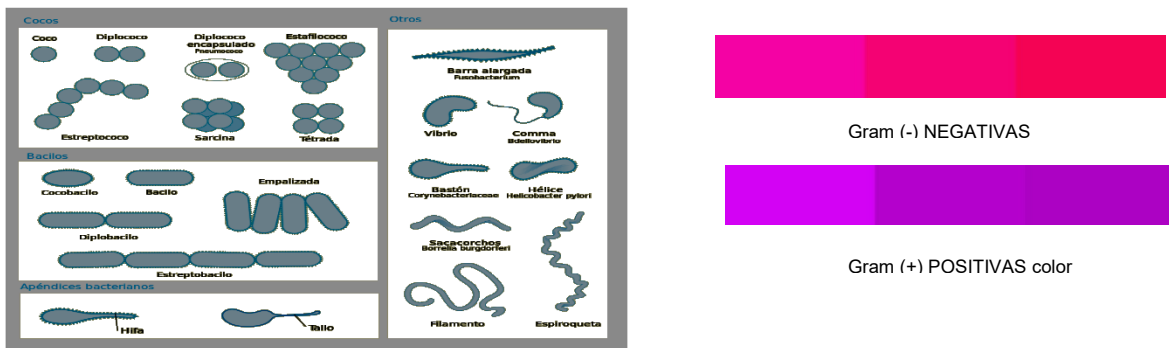
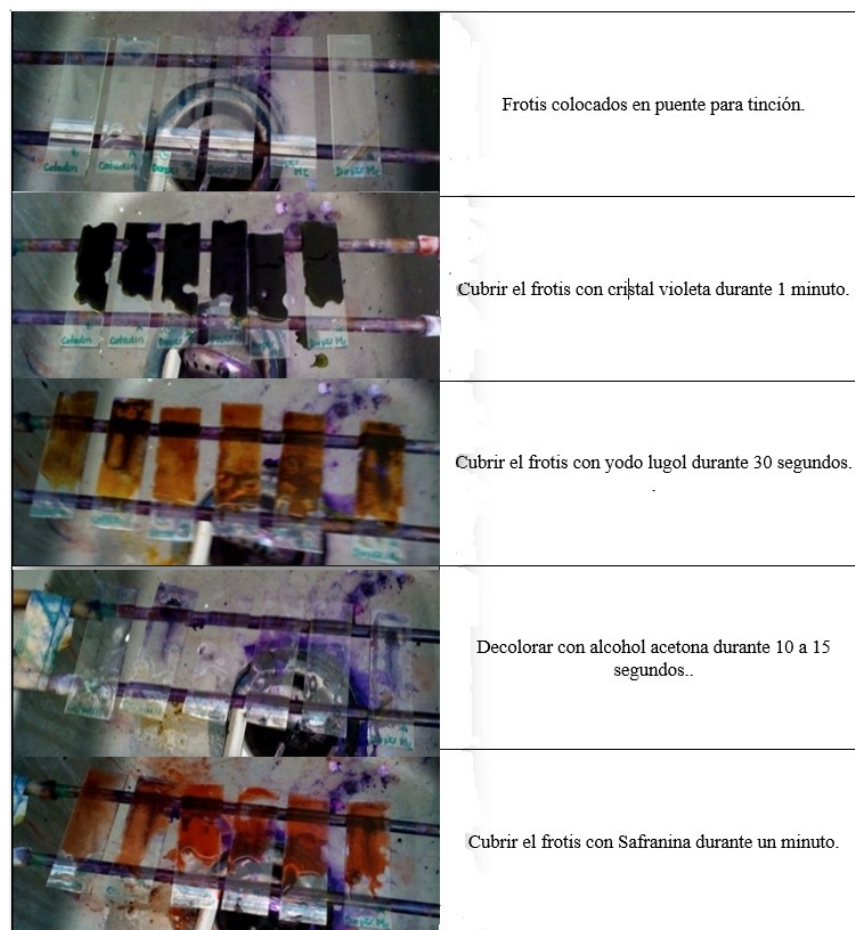


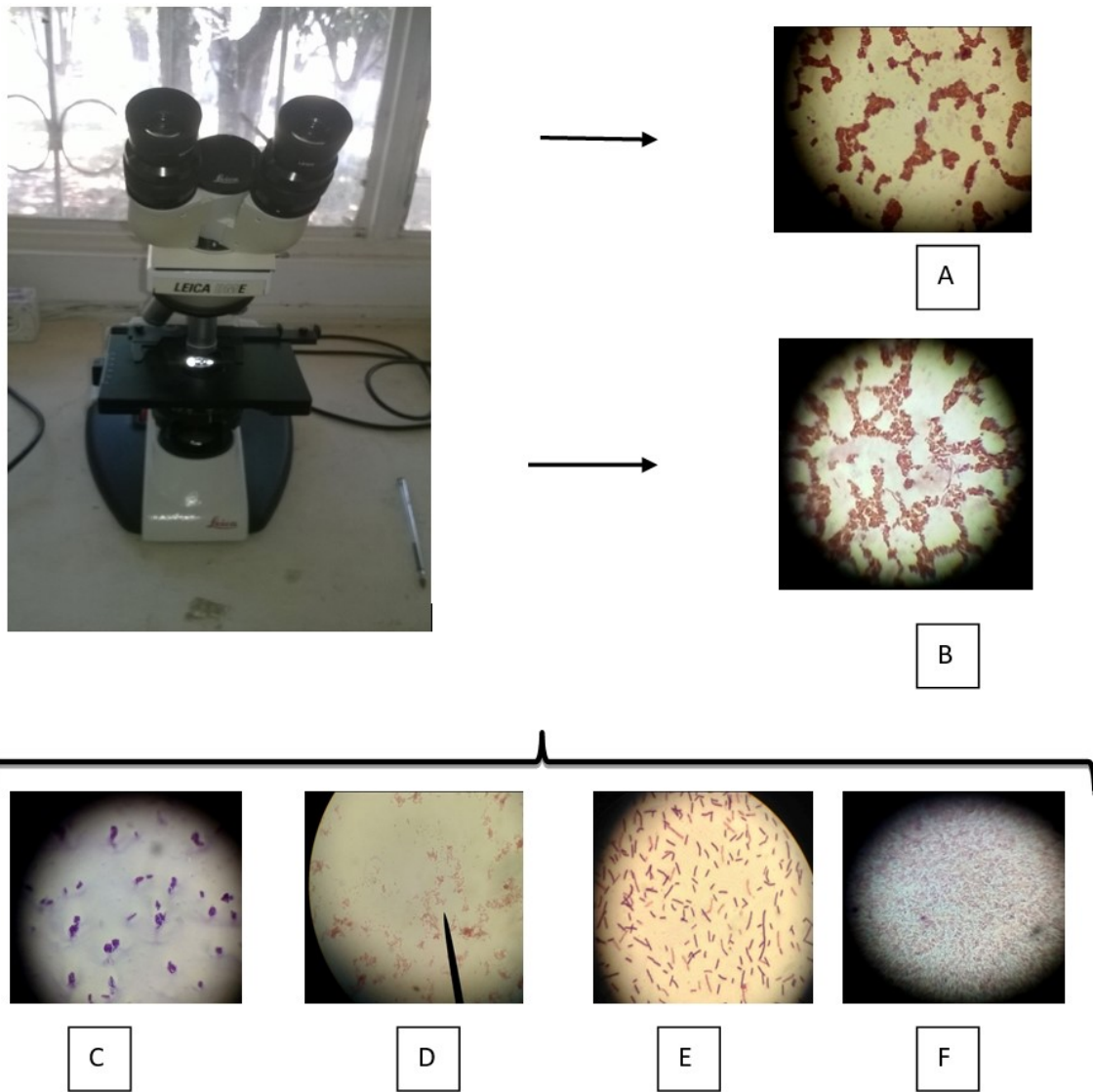
Figura 1.3 Procedimiento de la técnica de tinción de Gram



Fuente: Orozco, María (2016). Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil en práctica de laboratorio UAMVZ

Interpretación de tinción de Gram

Figura 1.4 Observación en microscopio compuesto con objetivo 100X



Fuente: Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil en práctica de laboratorio UAMVZ

Fotografías A y B). Bacterias Gram positivas agrupadas en grupos/tétradas. C) cocos positivos en pares. D) Cocos Gram positivos, E). Bacilos Gram negativos. F) Bacilos Gram positivos. Orozco, María (2016).

D. Tinción de Ziehl Neelsen

Introducción

Las bacterias ácido alcohol resistentes forman un grupo de microorganismos que se definen en base a sus propiedades tintoriales. Son relativamente impermeables a los colorantes básicos, pero una vez teñidos, retienen el colorante con tenacidad resistiendo la coloración con solvente orgánico acidificado (por ejemplo alcohol-ácido).

La ácido alcohol resistencia está determinada por la pared celular, la cual además de contener péptidoglicano, está constituido por un alto porcentaje de glicolípidos hidrofóbicos. Un componente importante de estos, son los ácidos micólicos. La presencia de estas capas hidrofóbicas previene la penetración de soluciones acuosas, siendo esta la causa por la cual estos microorganismos no pueden teñirse con métodos convencionales (tinción de Gram). Uno de los métodos más comúnmente usados para demostrar la ácido alcohol resistencia, es el método de Ziehl-Neelsen. En este método la penetración del colorante primario se facilita debido a que éste se encuentra disuelto en fenol y que es aplicado en presencia de calor.

Una vez que el colorante penetra a la célula bacteriana, este se combina con las mismas estructuras con las que se combina cualquier otra bacteria (ácidos nucleicos, proteínas, etc) y además reacciona con ácidos micólicos libres, lo cual hace que la pared celular se vuelva aún más hidrofóbica.

Con la tinción de Ziehl-Neelsen, tanto las bacterias ácido alcohol resistentes como las no ácido alcohol resistentes se tiñen con el colorante primario. Sin embargo, al aplicar el agente decolorante, compuesto por una mezcla de alcohol ácido, éste no solubiliza los lípidos de la pared de las bacterias ácido alcohol resistentes, y por lo tanto no se decoloran fácilmente, por lo que se vuelven a teñir al aplicar el colorante de contraste. Este grupo de bacterias está representado principalmente por el género *Mycobacterium*. Algunas especies de este género juegan un papel importante como agentes etiológicos de la tuberculosis y otras enfermedades crónicas granulomatosas tanto en el hombre como en los animales.

Procedimiento

El método utiliza un procedimiento similar al de la tinción de Gram, es decir: coloración inicial, decoloración y adición de un contra colorante o colorante de contraste. Tras la preparación del frotis, secado y fijación se procede como sigue:

1. Cubrir la preparación totalmente con carbol-fucsina o fucsina fenicada
2. Calentar la preparación hasta la emisión de vapores tres veces, dejando que se enfríe.
3. Lavar y decolorar con alcohol clorhídrico al 3% hasta que no suelte más colorante rojo.
4. Lavar y cubrir con azul de metileno durante unos minutos.
5. Lavar, secar y observar con objetivo de inmersión.

Las bacterias ácido alcohol resistentes quedan teñidas de rojo y las que no lo son, de azul.

Figura 1.5 Colorantes utilizados para tinción de Ziehl Neelsen



Fuente: Orozco, María (2016). Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

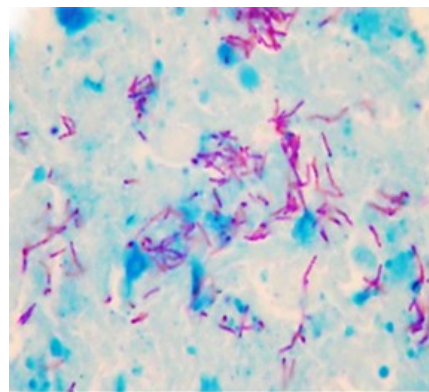
Interpretación de la tinción de Ziehl Neelsen

Figura 1.6 Observar al microscopio con el objetivo de 100 X



Fuente: Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Figura 1.7 Bacterias ácido alcohol resistentes teñidas de rojo y las que no lo son, de azul



Fuente: Fotografía del libro. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas Koneman

Cuestionario:

1. Qué características posee la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas?
- 2.Cuál es la función de cada uno de los reactivos que usaste en la tinción de Gram?

Hacer:

1. Realiza un esquema de la pared celular de bacterias ácido alcohol resistente nombrando sus estructuras
2. Menciona la utilidad diagnóstica de la tinción de Ziehl Neelsen
3. Enliste 5 especies de bacterias ácido alcohol resistente de importancia médico y veterinario.
4. Menciona la importancia en patogenicidad de los componentes de la pared celular de Mycobacterium

Práctica 2 Inoculación de medios de cultivo en placa y observación de morfología colonial

El laboratorio de análisis de será el lugar donde se realice la práctica, teniendo capacidad para un máximo de 15 estudiantes, quienes podrán formar equipos de 5 estudiantes cada uno.

Introducción

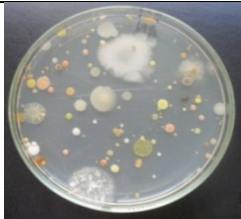


La inoculación en medios de cultivo es el contacto de los microorganismos con el medio. La inoculación de medios de cultivo en el laboratorio para el desarrollo e identificación de microorganismos es un procedimiento fundamental e importante y el uso de técnicas apropiadas dará por resultado un óptimo crecimiento. Las inoculaciones se realizan utilizando asas de nicromo o de platino y deben de hacerse cerca del mechero, evitando movimientos bruscos o excesiva lentitud en las manipulaciones para evitar contaminación.

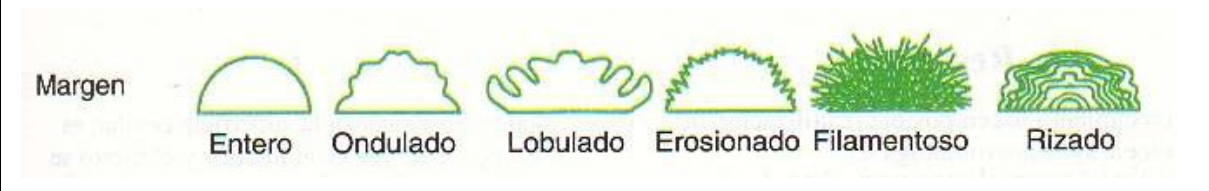

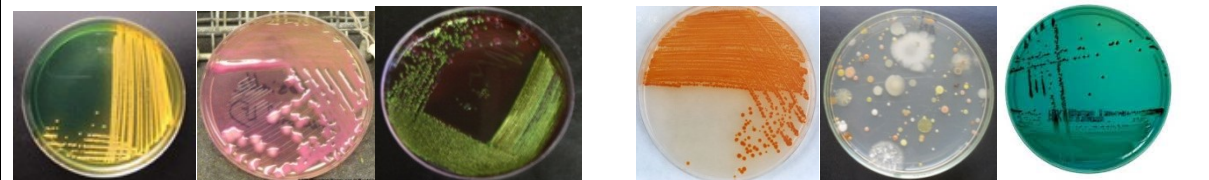
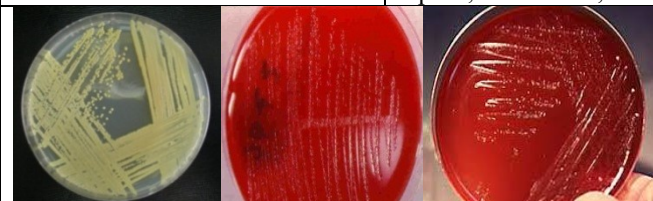

Morfología colonial:

La evaluación de las características microscópicas de las colonias que se desarrollan sobre una placa de agar, es una de las bases de la microbiología diagnóstica ya que es útil para establecer una identificación bacteriana preliminar a través de su examen visual (figura 4).

La observación de las colonias debe realizarse inclinando las palcas en distintas direcciones bajo una luz brillante. Se puede utilizar una lupa o un microscopio estereoscópico para observar con mayor detalle las formas de las colonias sobre el agar, sobre todo cuando su tamaño es muy pequeño.

Tabla 2.1 Interpretación de la morfología colonial

Morfología colonial	
Termino	Características
Tamaño	Diámetro (mm) 
Forma	Puntiforme, circular, irregular, filamentosa, fusiforme y rizoide
Forma	 <p>Puntiforme Circular Filamentosa Irregular Rizoide Fusiforme</p>
Elevación	Plana, elevada, convexa, abovedada, umbonada, pulvinada, crateriforme.
Elevación	 <p>Plana Elevada Convexa Pulvinada Umbonada</p>

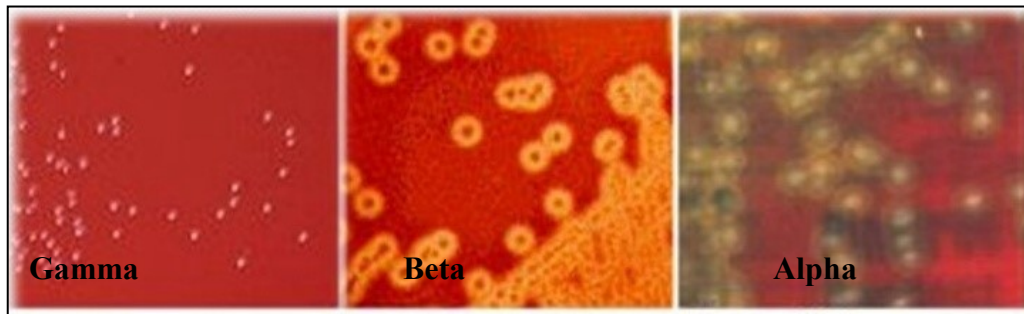
Borde	Entero, ondulado, lobulado, estriado y lobulado, dentado y rizoide
Margen	
Color	Blanco, negro, amarillo, naranja, ect.
	
Superficie	Brillante, mate.
	
Densidad	Opaca, translúcida, transparente.
	
Consistencia	Cremosa, viscosa, membranosa, quebradiza o rugosa
	
Olor	Fétido, a uvas, a pescado, etc.

Fuente: Fotografías tomadas del libro Diagnóstico microbiológico texto y atlas a color. Koneman

Reacción de hemólisis

Cuando se inocula en agar gelosa sangre, es posible observar adicionalmente a la morfología colonial, una reacción llamada hemólisis, producida por microorganismos que destruyen los eritrocitos del medio de cultivo, debido a la producción de toxinas. La reacción se observa como una zona transparente alrededor de las colonias hemolíticas.

Figura 2.2 Patrones de tipo de hemólisis



Fuente: Fotografía tomada del libro de diagnóstico microbiológico texto y atlas a color. Koneman

Desarrollo de la práctica

Objetivos

- Obtener destreza para aislar colonias de bacterias mediante la inoculación de medios de cultivo en placa.
- Identificar en forma preliminar a las bacterias por su morfología colonial y algunas características de crecimiento.

Material

- Placa de Agar
- (EMB, SS, agar 110, Agar sangre, Según sea su uso)
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Incubadora
- Marcador permanente
- Muestra Biológica (excremento, alimento, exudados, fluidos)

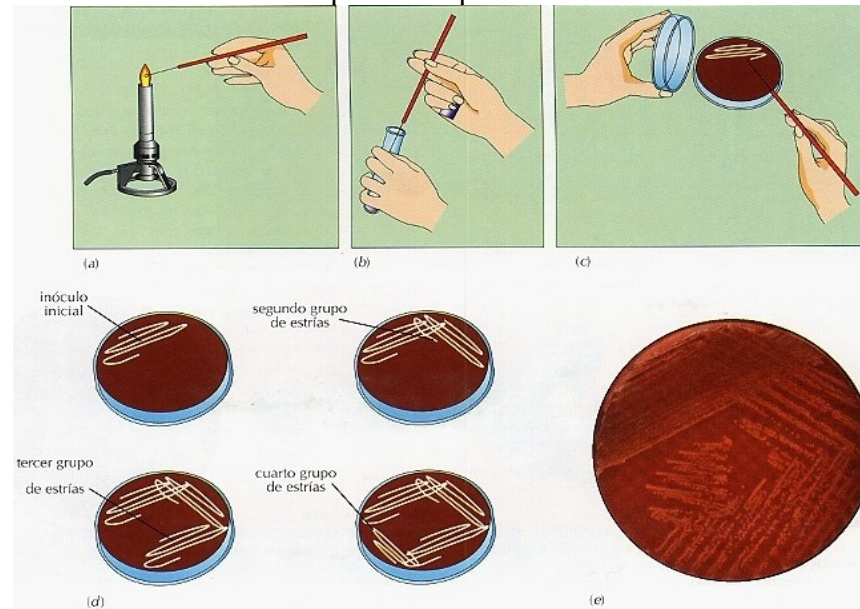
Método

Inoculación de medios sólidos por la técnica de estría

1. tomar un inóculo bacteriano con el asa de nicromo estéril y fría.
2. extender el inóculo sobre una parte de la superficie del medio, al que se llamará zona de descarga.
3. esterilizar nuevamente el asa de nicromo en la llama de reducción y posteriormente en la de oxidación, con la finalidad que el inóculo se proyecte.
4. trazar estrías a partir de la zona de descarga, de manera que cubra otra porción de la superficie del agar para diluir el inóculo. Tener cuidado de no penetrar la superficie del agar.
5. esterilizar el asa y volver a trazar estrías hasta cubrir toda la superficie,
6. al terminar la inoculación esterilizar nuevamente el asa.

7. Rotular las cajas de petri con los nombre de cada equipo y demás datos importantes.
8. incubar las cajas a 37°C por 24 h.
9. Pasado el tiempo de incubación, observar la morfología colonial.

Figura 2.3 Técnica de inoculación por estría para el aislamiento de colonias bacterianas




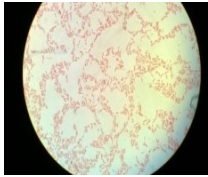
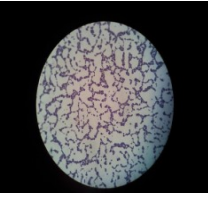
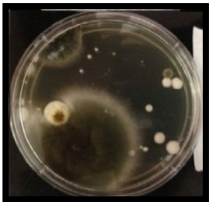
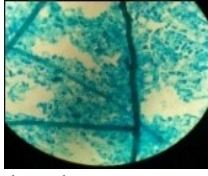

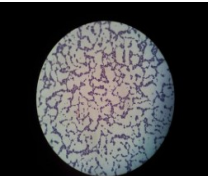
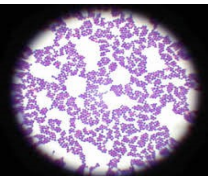
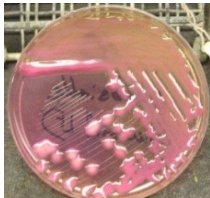
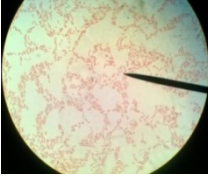
Fuente: Fotografía tomada del libro diagnóstico microbiológico texto y atlas. Koneman

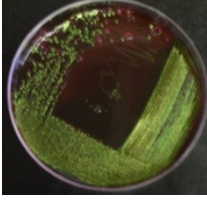
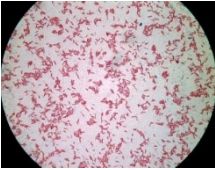
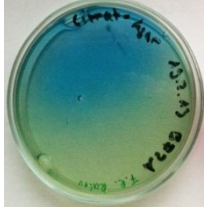
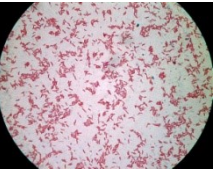

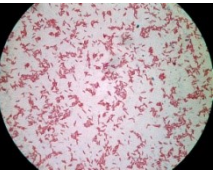

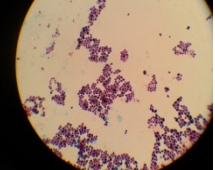
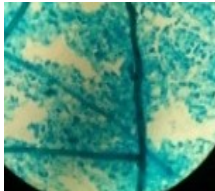
Figura 2.4 Técnica de inoculación por estría para el aislamiento de colonias bacterianas



Fuente: Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Tabla 2.2 Resultados de la siembra por estría en placa en diferentes medios de cultivo y tinción de Gram

Agares sembrados, frotis y resultados				
Agar	Imagen	¿Para qué se utiliza?	muestra	Resultado
Métodos Estándar		Es un medio utilizado para el recuento de bacterias aeróbicas a partir de agua, aguas residuales, alimentos y productos lácteos.	Agua de bebedero de los cerdos	 Gram -  Gram +
Dextrosa Sabouraud		Es un medio utilizado en procedimientos cualitativos para el cultivo de hongos y levaduras.	Alimento comercial para consumo de cerdo	 levaduras
Base agar Sangre (BS)		Es un medio utilizado para facilitar el crecimiento de microorganismos exigentes, bacterias Gram negativas y Gram positivas, Permite observar los tipos de hemólisis.	Exudado faringeo	 Gram +  Gram +
Salmonella Shigella (SS)		Es un medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de Salmonella spp. Y de algunas de Shigella spp	Heces de cerdo.	 Gram -

Eosina azul de Metileno (EMB)		Es un medio de cultivo diferencial para el aislamiento de enterobacterias, utilizado para la diferenciación entre organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa.	Heces de bovino	 Gram -
citrato de Simmons (CS)		Es un medio de cultivo utilizado para la diferenciación de enterobacterias.	Heces de perro	 Gram -
Mac Conkey		Es un medio de cultivo en el cual las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram (+).	Heces de cerdo	 Gram -
Extracto de malta		Es un medio de cultivo que permite el crecimiento de (mohos y levaduras	Alimento comercial para cerdo	 levaduras  levaduras

Fuente: Orozco, María (2016). Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Cuestionario

1. Qué es un medio de cultivo selectivo?
2. Que es un medio de cultivo diferencial?
3. Enlista los medios de cultivo que utilizaste en esta práctica?
4. Para el transporte y conservación de las muestras (bacteriológicas) es necesario utilizar un medio de transporte, cual fue el que utilizaste en esta práctica,
5. Tus resultados coinciden con los de la literatura revisada? escribe tus diferencias y conclusiones.
6. Que medios de cultivo de los que usaste en a práctica favorecieron más el crecimiento de levaduras?

Práctica 3 Examen general de orina

El laboratorio de análisis de será el lugar donde se realice la práctica, teniendo capacidad para un máximo de 15 estudiantes, quienes podrán formar equipos de 5 estudiantes cada uno.

Introducción

El análisis de orina es una prueba de laboratorio simple, no invasiva y económica; y que consiste en la evaluación de las propiedades físico-químicas de la orina, la estimación de la concentración de sus solutos, y el examen microscópico del sedimento. Indicado tanto en pacientes con sospecha de enfermedad del sistema urinario como en pacientes con desordenes no urinarios, ya que aporta información de varios sistemas corporales (Núñez y Bouda 2007).

El urianálisis está indicado en las siguientes situaciones:

- Ayuda en el diagnóstico diferencial de enfermedades renales y otras enfermedades.
- Diagnóstico de varias enfermedades y trastornos en etapas subclínicas.
- Monitoreo de enfermedades.
- Monitoreo de eficacia y seguridad de tratamientos.
- Parte del examen pre-quirúrgico.
- Se realiza en todos los animales enfermos, con problemas urinarios, y con pérdida de peso corporal.

El Urianálisis, consta de 3 exámenes que se realizan en un orden específico, para que los resultados sean lo más fiable posible. El orden en que se realiza es el que sigue:

- Examen Físico (Color, Olor, Transparencia y Viscosidad).
- Examen Químico (Densidad, pH, Proteína, Glucosa, Cuerpos Cetonicos, Bilirrubina, Urobilinogeno, Nitritos, Sangre y Leucocitos).
- Examen del Sedimento Urinario (Estructuras Organizadas, Estructuras No Organizadas).

Urianálisis

Consiste en la evaluación de las propiedades físico-químicas de la orina, la estimación de la concentración de sus solutos, y el examen microscópico del sedimento. Indicado tanto en pacientes con sospecha de enfermedad del sistema urinario como en pacientes con desordenes no urinarios, ya que aporta información de varios sistemas corporales. Como casi todos los test laboratoriales, los resultados del urianálisis son válidos pero no infalibles, y su valor diagnóstico es directamente proporcional a la capacidad que se tenga para interpretarlos.

Orina

(Del latín *urina*) es un líquido acuoso transparente y amarillento, de olor característico (sui generis), secretado por los riñones y eliminado al exterior por el aparato urinario. La orina puede servir para determinar la presencia de algunas enfermedades.

Figura 3.1 Orina



Fuente: Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ.

Hacer una manipulación aséptica de la sonda sujetando la sonda a través del envoltorio sólo por el extremo distal o usar guantes. Para minimizar las molestias del paciente se debe usar lubricante o anestésico local.

Se debe estimar la longitud de sonda necesaria para alcanzar el cuello de la vejiga para evitar así la excesiva introducción de la sonda en el interior de la vejiga. Se sujeta al perro en estación (de pie) o en decúbito lateral. Otra persona extrae suavemente el pene del prepucio, se lubrica la sonda con un lubricante estéril hidrosoluble o que contenga anestésico local, se inserta en el orificio uretral y se hace avanzar suavemente la sonda, en un momento dado se percibe cierta resistencia (al pasar por el arco isquiático). Normalmente aparece la orina por la sonda, a veces puede ser necesario aspirar suavemente con una jeringa, se deben desechar los primeros mililitros de orina. Una vez completado el procedimiento se extrae la sonda lentamente.

Canino (Hembra)

El procedimiento se hace con la hembra de pie o tumbada, apoyada sobre el esternón. El sondaje de las perras hembras se facilita si se puede visualizar el orificio uretral externo con la ayuda de una fuente de luz y un espéculo. El orificio uretral externo (por donde tenemos que introducir la sonda) se localiza sobre una tuberosidad en la parte ventral, en el suelo de la vagina. Se introduce suavemente el espéculo por la vagina, preferiblemente lubricado, en dirección hacia arriba y hacia delante. Se localiza el meato uretral y se introduce la sonda a través del espéculo en el orificio uretral, avanzando hacia la vejiga. La cateterización es un método actualmente en desuso pues la mayoría de los clínicos lo evitan debido a que constituye un riesgo de infección del tracto urinario bastante elevado.

Figura 3.2 Obtención de orina con la técnica de cistocentesis



Fuente: Orozco, María (2016). Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Esta técnica consiste en obtener orina pinchando la vejiga a través de la pared abdominal. Obtenemos orina estéril necesaria para realizar el cultivo y antibiograma. El procedimiento se puede realizar con el animal tumbado de lado o con el abdomen hacia arriba, incluso en perros puede hacerse con el animal de pie. Se coloca al animal y se palpa la vejiga para ver su tamaño y localización, inmovilizando la vejiga con la mano libre; si la vejiga está vacía no se debe llevar a cabo este procedimiento. Hay que insertar la aguja lentamente a través de la cavidad abdominal y de la pared vesical, la aguja se dirige formando un ángulo de 45°. Aspirando con la jeringa se debe obtener orina.

Micción Espontánea

La orina se recoge durante la micción o mientras se exprime manualmente la vejiga. La orina de micción espontánea limpia es la muestra indicada para el urocultivo. Si la muestra se va a usar para el diagnóstico de enfermedades de la vía genital, debe recogerse la orina de la primera parte de la micción y no de la parte media.

Desarrollo de la práctica

Objetivo

El alumno realizara el examen general de orina, conocerá el fundamento de las pruebas, como la tira reactiva, identificara los elementos del sedimento urinario y conocerá las recomendaciones para la adecuada recolección de la muestra.

Materiales:

- Recipiente Estéril para muestra de Orina
- Tubo de ensaye
- Tira reactiva de Orina
- Pipetas
- Portaobjetos
- Centrifuga

- Cubreobjetos
- Microscopio
- Muestra Biológica: Orina

Examen físico

Volumen, olor, color, aspecto y densidad.

Volumen

Tabla 3.1 Volumen

Especie	Litros / 24 hrs	Micciones
Bovino	6 – 12	5 – 7
Equino	3 – 7	5 – 7
Ovino	0.5 – 1	1 – 3
Cerdo	2 – 4	2 – 4
Perro	0.25 – 1	2 – 3
Gato	10 – 20 mL / kg / 24 hrs	Varia
Conejo	100 – 300 mL	2 – 3
Humano	900 – 2 500 mL	varia

Volumen de orina promedio y número de micciones realizadas en 24 Hrs. Tomada del manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping.

Olor

- Sui-generis (especie-especifico)
- Nauseabundo
- putrefacto

Interpretación.

Existen olores que nos dan indicio de alteraciones, como son:

- Amoniacal: cistitis y otros procesos inflamatorios de las vías urinarias, orinas conservadas en recipientes cerrados a temperatura ambiente y sin conservantes.
- Fétido: presencia de abundante pus, pielonefritis (consecuencia de la descomposición del pus, cilindros y coágulos mezclados con la orina).
- Pútrido: destrucción de tejidos
- Olor a Frutas Maduras: cetosis de la vaca, gestación patológica, diabetes glucosúrica, ascaridiasis, de terneros y corderos.
- Olor a ciertos medicamentos: ácido fénico, alcanfor, aceite de trementina.

Aspecto

Interpretación

Clara

La orina recién evacuada por el animal es comúnmente clara, salvo en el caballo que es normalmente espesa y nebulosa, debido a cristales de carbonato de calcio y mucus. La transparencia o claridad de la orina puede ser anormal en toda poliuria y en equinos con orina ácida.

Nebulosa/Turbia

No es necesariamente patológica, ya que muchas muestras de orina se vuelven nebulosas al cabo del tiempo las causas de turbidez de la orina siempre debería identificarse microscópicamente. Entre las causas de turbidez tenemos los siguientes:

- Células epiteliales.
- Sangre (color que va del rojo al castaño, y humosa).
- Leucocitos (aspecto lechoso, glutinoso).
- Nefritis y nefrosis intensas (enturbiamiento en forma de hilos, cilindros).
- Pielonefritis bacterianas (masas espesas gelatinosas en la orina).
- Bacterias (turbidez uniforme, la cual no se sedimenta ni puede quitarse por filtración).
- Mucus, exudado o pus procedente de procesos inflamatorios de las vías urinarias y órganos genitales que comunican con ellos.
- Cristales:
- Carbonato de calcio: en orina fresca de caballo o en orina de los bovinos al cabo de algún tiempo de emitida.
- Uratos amorfos: una nube blanca o de color rosa en la orina ácida al cabo de un tiempo, o bien al enfriarla rápidamente.
- Fosfatos amorfos: una nube blanca en la orina alcalina.

Color

Interpretación

Normal: De amarillo paja - amarillo claro - amarillo ámbar. El color normal de la orina es amarillo o ámbar y se debe fundamentalmente a la presencia de dos pigmentos: urocromos y urobilina. El color de la orina puede variar por diversas causas, y puede producirse tanto por pigmentos exógenos como endógenos.

Un color amarillo oscuro, normalmente indica que la orina está concentrada, si la orina es diluida el color es amarillo muy claro, por ello el color debe ser interpretado junto a la Densidad Urinaria.

Figura 3.3 Colores de la orina de diferentes especies animales

Fuente: Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Tabla 3.2 Ejemplos de colores anormales de orina y su causa

Colores anormales de la orina		
Color	Color	Causa
Amarillo muy oscuro		Orina muy concentrada, bilirrubinuria.
Blanco lechoso		Pus, cristales de fosfato
Roja o marrón rojizo		Hematuria, hemoglobinuria, mioglobinuria.
Marrón oscura a negro		Metahemoglobinuria.
Amarillo amarronado o verde amarronado		Muestra concentrada, bilirrubina, Pseudomonas.
Verde o azul verdoso		Azul de metileno, Ditiazinina iodada.
Naranja		Bilirrubina, AZO-GANTRISIN®

Fuente: Tomada del manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

Tabla 3.3 Interpretación de los resultados del color de la orina

Color de la orina	Interpretación
Orinas Incoloras, orina diluida, poco densa; relacionado con poliuria	<ul style="list-style-type: none"> - Grandes diuresis por mercuriales - Diabetes insípida (densidad baja) - Insuficiencia renal avanzada
Orinas Amarillas Intensas, orina concentrada, muy densa y escasa	<ul style="list-style-type: none"> - Ictericia, cualquier sea su origen - Anemia pernicioso - Anemia hemolítica
Orina Roja o Rosada	<ul style="list-style-type: none"> - Anemia pernicioso - Anemia hemolítica - Algunos medicamentos como fenotiazina, neoprontosil, fenoltaleina
Orina Parda (cerveza negra)	<ul style="list-style-type: none"> - Ictericias parenquimatosas y mecánicas - Hematurias por Glomerulonefritis aguda - Metahemoglobinurias: intoxicación por clorato de potasio, nitritos, anilinas
Orina Negruzca	<ul style="list-style-type: none"> - Melanosarcomas y otros tumores mecánicos - Alteración del metabolismo de la tirosina - Hematurias graves
Orina Lechosa	<ul style="list-style-type: none"> - Quiluria (liq. Linfático en la orina) - Lipurias masivas

Fuente: Tomados del manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

Examen Químico

Se utiliza la tira reactiva de orina, que es un instrumento de diagnóstico básico, tiene como finalidad detectar, durante un examen rutinario de orina, algunos de los cambios patológicos que pueden aparecer en la orina del paciente. Coloca la tira reactiva de 15 a 30 segundos dentro de la orina, luego retírala, y retira el exceso de orina que quedo en la parte trasera de la misma, y déjala reposar con las almohadillas por la parte de arriba. Coloca la tira sobre la imagen que tiene el frasco de tiras reactivas para orina, y compara los colores y escribe tus resultados.

Figura 3.4 Examen químico de orina para la interpretación de los resultados

Fuente Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Leucocitos

Normal: 0-2 (Si la orina es recogida mediante citocinesis es normal encontrar hasta 5 leucocitos/campo (x40)).

En orinas frescas aparecen como células esféricas 1½ veces mayor que los eritrocitos y más pequeños que las células del epitelio de transición. Son difíciles de diferenciar de las células epiteliales de los túbulos renales. Los leucocitos se lisan si la orina es alcalina o hipostenúrica.

El cambio de color de la almohadilla en la tira reactiva indica inflamación del tracto urinario, infección del tracto urinario (la ausencia de leucocitos no excluye infección).

Nitritos

La presencia de nitritos en la orina puede utilizarse para indicar la existencia de bacterias. Para la determinación de Nitritos Urinarios se realiza, mediante tiras reactivas de diferentes laboratorios. La mayoría utilizan una amina aromática que reacciona con el Nitrito para formar un compuesto diazoico que se visualiza por el cambio de color (Messeguer *et al.* 1992).

Interpretación

- Dan falsos positivos: orinas que llevan mucho tiempo recolectadas.
- Dan falsos negativos: ácido ascórbico a altas dosis y antibióticos.

Urobilinogeno

El urobilinogeno es excretado en las heces en forma de estercobilina (pigmento que contribuye al color castaño oscuro en las heces), pero algo es absorbido en el intestino y transportado en la sangre portal hasta el hígado, donde es reciclado y excretado en la bilis. Una pequeña cantidad de urobilinogeno pasa a través del filtrado glomerular a la orina (Duncan y Prasse 2005).

Interpretación

Ausencia de Urobilinogeno

- Obstrucción completa del conducto biliar.
- Escasa destrucción de eritrocitos.
- Desarreglos de la absorción intestinal (como en la diarrea).
- Ciertos antibióticos: como aureomicina, debido a la inhibición de las bacterias intestinales
- Cirrosis del hígado.
- Nefritis: debido a la dilución del urobilinogeno, ocasionada por la poliuria inherente a la nefritis crónica.

Aumento de Urobilinogeno

- Procesos hemolíticos en los que aumenta el urobilinogeno eliminado por el riñón.
- Anemia hemolítica.
- Anemia perniciosa.
- Cuando hay reducción funcional de la masa hepática.
- Ictericia hepatocelular.

Todos los trastornos hepáticos en los que disminuye la capacidad del hígado para eliminar el urobilinogeno.

Proteínas

En condiciones normales, la orina no contiene sustancias proteicas, al menos en cantidades suficientes para ponerlas de manifiesto con las técnicas analíticas de rutina . La proteína que con mayor frecuencia se encuentra en orina son las que proceden del plasma sanguíneo y constituyen generalmente una mezcla de albuminas y globulinas. Debido a que la albumina plasmática tiene un peso molecular menor que la globulina, generalmente, predomina la albumina y la proteinuria se expresa indistintamente como albuminuria (Messeguer *et al.* 1992).

- Proteínas Verdaderas, son las proteínas coagulables o hemáticas: Albumina, Globulinas, Fibrinógeno.
- Falsas Proteínas: Derivados de hidrólisis de proteínas: Albumosas, Proteosas, Peptosas.
- Proteínas específicas: Albumina de Bence-Jones.
- Otras Proteínas: Seudoalbumina, Albuminas espermáticas, nuclealbuminas, Mucoproteínas.

Interpretación

Tabla 3.5 Concentración de proteína en orina

Intensidad de proteinuria	g/día	Interpretación
Marcada	4	- Típica del Síndrome Nefrótico - Glomerulonefritis severas - Nefrosclerosis
Moderada	0.4 a 4	- En la mayor parte de las enfermedades renales - Glomerulonefritis crónica - Nefropatía toxica
Mínima	0.5	- Enfermedades poliquísticas de riñones - Desordenes túbulo-renales

Fuente: Valores consultados en el manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

pH

El pH indica la concentración de iones hidronio (H_3O^+) presentes en determinadas sustancias. Es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución (Benjamín 1962). Los riñones y los pulmones son los órganos principales en la regulación del equilibrio ácido-base. El pH de la orina de los animales sanos está influenciado por la composición del alimento y el metabolismo del animal (Messeguer *et al.* 1992).

En equinos y rumiantes la orina es alcalina, debido a la preponderancia de carbonatos alcalinos tras la combustión de sales de ácidos vegetales en el metabolismo), en carnívoros la orina es ácida por el predominio de fosfatos monosódico y monocálcico; mientras que en los porcinos al ser omnívoros, la orina será ácida cuando la dieta contenga grandes cantidades de proteína y cereales, y será orina alcalina cuando la dieta sea sobre todo con hidratos de carbono.

Tabla 3.6 Valores de pH en orinas de diferentes especies

Especie	pH
Equino	Alcalino 8
Bovino	Alcalino 7.4 – 7.8
Ovino	Alcalino
Caprino	Alcalino
Porcino	Acido o Alcalino
Canino	Acido 6 – 7
Felino	Acido 6 – 7
Humano	4.8 – 7.5

Fuente: Valores consultados en el manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

Interpretación

Aciduria

- En las primeras fases de vida de los rumiantes (fisiológico).
- Acidosis metabólicas (diabetes mellitus, uremia, cetosis) y respiratorias.
- Medicación acidificante (cloruro de amonio, ácido mandelico cloruro sódico, cloruro cálcico, fosfato de sodio, metionina).
- Diarreas graves.
- Dietas excesivamente ricas en proteínas (aciduria transitoria).
- Procesos de adelgazamiento.
- Tras esfuerzos o fatiga excesiva.
- Excesivo catabolismo de proteínas corporales: Periodos de hambre, Procesos febriles,
- Diabetes mellitus, Insuficiencia renal crónica.

Alcaluria

- Retraso en el examen de las muestras y conservación de las mismas, pues se forma amoniaco a partir de urea.
- Fisiológicamente en herbívoros que ingieren dietas vegetales.
- En casi todos los casos que aparece alcalosis sistémica.
- Infecciones del tracto urinario (cistitis) asociadas con presencia de M.O. que transforman urea en amoniaco y bicarbonato.
- Medicamentos alcalinizantes (bicarbonato sódico, lactato sódico, citrato sódico, acetazolamida, nitrato sódico).
- Retenciones urinarias en la vejiga.
- Alcalosis metabólicas (vómitos, ingesta excesiva de bicarbonatos) o respiratorias (síndrome de hiperventilación).
- Acidosis renal tubular (los riñones son incapaces de eliminar iones de hidrogeno aunque exista una severa acidosis corporal).

Sangre

La presencia de sangre o hemoglobina libre en la orina, es siempre patológica y recibe nombres distintos según se trate de uno u otro elemento

- Hematuria: presencia de sangre total en la orina.
- Hemoglobinuria: presencia de pigmento hemático (hemoglobina) libre en la orina.
- Mioglobinuria: presencia de mioglobina en orina.

Interpretación

Tabla 3.7 Presencia de sangre en orina

Hematuria	<ul style="list-style-type: none"> – Orina roja y turbia, que se aclara con centrifugación. – Eritrocitos en el sedimento urinario. – Ausencia de evidencia clínica o laboratorial de anemia hemolítica o enfermedad muscular.
Hemoglobinuria	<ul style="list-style-type: none"> – Orina roja a marrón que no se aclara tras la centrifugación – Ausencia de eritrocitos en el sedimento urinario. – Decoloración roja concomitante del plasma (hemoglobinemia).
Mioglobinuria	<ul style="list-style-type: none"> – Orina roja a marrón que no se aclara tras la centrifugación. – Ausencia de eritrocitos en el sedimento urinario. – Plasma claro, de color normal.

Fuente: Valores tomados del manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

Glóbulos rojos

Los valores normales son de hasta 3 – 8 eritrocitos/campo (40 X) dependiendo del método de recogida. En orinas muy concentradas aparecen crenados y con formas anómalas, y en orinas diluidas se hinchan y se ven con formas redondeadas. Presencia: iatrogenia, urolitiasis, Inflamación, Neoplasia.

Densidad

Es el peso o densidad de un volumen medido de una sustancia, expresado en relación con el mismo volumen de agua pura. Significa la relativa cantidad de sólidos en solución. La densidad o peso específico de la orina expresa la capacidad que tiene el riñón para concentrar y diluir el filtrado glomerular (DuncanPrasse 2005).

La densidad de la orina aumenta con la concentración de material disuelto en ella; en una orina normal este material consiste principalmente en electrolitos y desechos nitrogenados como urea y creatinina..

Densidad Inferior al normal

- Nefritis intersticial crónica: debido a la incapacidad renal para concentrar la orina.
- Uremia, en casos avanzados.
- Diabetes Insípida: debido a la pérdida de hormona antidiurética.
- Ingestión excesiva de líquidos.
- Piometrio: por excesiva ingesta de agua.

Densidad Superior al normal

- Nefritis intersticial aguda: debido a la incapacidad para excretar agua.
- Cistitis: se adiciona a la orina productos de la reacción inflamatoria.
- Ingestión escasa de fluidos.
- Deshidratación.
- Vómitos y diarreas, si son prolongados

Cetonas

Cuando la cantidad de ácidos grasos movilizados es grande, se metabolizan incompletamente y se forman compuestos intermediarios del metabolismo de las grasas, que aparecen en sangre y son excretados por la orina. Estos productos son los cuerpos cetónicos: ácido acetacético (diacético), acetona y ácido beta-hidroxibutírico (Messeguer *et al.* 1992).

- Cetosis (acetonemia): por metabolismo deficiente de los carbohidratos; se da en vacas preñadas y lactantes, y en ovejas preñadas (Asociada con hipoglucemia). Distinguir entre cetosis grave y la cetosis benigna de un animal que deja de comer por otras causas patológicas.

- Diabetes (Asociada con hiperglicemia, como falta de utilización normal de los carbohidratos).
- La cetosis clínica es rara en perros, cuando se observa en estos animales, suele estar asociada con diabetes, por lo que esta debe ser la primera afección a investigar.
- Acidosis.
- Dieta demasiado grasa.
- Inanición o ayuno.
- Agotadas las reservas de carbohidratos, el metabolismo de las grasas es predominante.
- El perro adulto es relativamente resistente al desarrollo de la cetosis durante el ayuno; pero en los cachorros, se observa un desarrollo notable de cetosis.
- Trastornos en la función hepática.
- Después de anestesia con éter o cloroformo.
- Vómitos y diarrea prolongada: cetosis por inanición.
- Enfermedades infecciosas: asociada con desequilibrio térmico.
- Fiebre de leche: si es prolongada.
- Desordenes endocrinos.
- Hiperfunción de la pituitaria anterior o de la corteza adrenal.
- Exceso de hormonas sexuales femeninas.

Bilirrubina

La Bilirrubina se elimina en la sangre circulante al pasar por el hígado que la conjuga con el ácido glucurónico y luego es vertida al intestino por el tracto biliar. Cuando la ruta de salida está deteriorada (obstrucción del conducto biliar debido a cálculos o tumores, o bien obstrucción intrahepática debida a la hinchazón de células dañadas), la bilirrubina conjugada refluye nuevamente al torrente circulatorio.

Esta bilirrubina conjugada o directa es soluble en plasma y por tanto se filtra a través del glomérulo, pudiendo encontrarla en la orina; por el contrario, la bilirrubina indirecta, no conjugada, ligada a una albumina, no se excreta a menos que también se presente albuminuria (Messeguer *et al.* 1999).

Carnívoros

En estados fisiológicos, febriles o consecuencia de inanición, puede dar test débilmente positivos. Esto no necesariamente indican existencia de trastornos hepáticos. (Solo debe considerarse una positividad significativa cuando aparezcan niveles medios o altos)

Bovinos

La interpretación debe ser muy cuidadosa, atendiendo a la anamnesis del animal en cuestión. Se ha comprobado que solo el 60% de los bovinos que presentan hepatopatías evidencian bilirrubina en sus orinas.

Equinos

La prueba es poco significativa.

Glucosa

La glucosa es el azúcar que comúnmente se busca en la orina, aunque pueden existir otros hidratos de carbono de importancia diagnóstica. Pueden hallarse otros azúcares como lactosa, fructosa, galactosas o pentosas.

La glucosa se filtra libremente por el glomérulo y entra en la parte proximal del túbulo, donde un sistema de transporte activo específico la reabsorbe y devuelve a la circulación. Normalmente, casi toda la glucosa es reabsorbida del filtrado tubular proximal y muy poca pasa a la orina, pero en algunos casos la concentración de glucosa puede exceder la capacidad del sistema de transporte tubular y entonces la glucosa pasa a la orina (Medway *et al.* 1973).

Interpretación

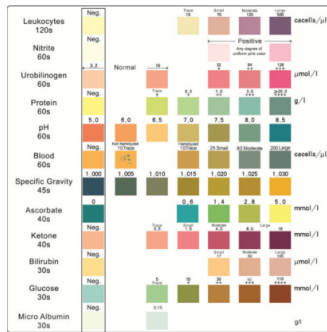
Procesos Renales

- Siempre que haya una imposibilidad para que la glucosa filtrada sea reabsorbida a nivel tubular (Algunos casos de nefritis o Cuando haya disminución en el dintel renal para la glucosa).
- En la enterotoxemia de la oveja por *Cl. perfringens*.
- Tras la administración de grandes dosis de Vitamina C.
- De origen tóxico o medicamentoso.

Procesos Extrarrenales

- Diabetes Mellitus.
- Estados de pancreatitis, que llevan consigo la disminución en la producción y liberación de la insulina (ej. Necrosis pancreática aguda).
- Hipertiroidismo.
- Hiperpituitarismo.
- Enfermedades hepáticas crónicas.
- Aumento de presión intracraneal (tumores hemorragias, encefalitis, fracturas).
- Incremento de la actividad de la corteza adrenal.

Figura 3.5 Tira reactiva para urianalisis



Fuente: Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Cuestionario

1. Cuál es la importancia clínica de hacer el examen general de orina?
2. Realiza una tabla de resultados, con los datos que obtuviste al trabajar tus muestras de orina?
3. Explica porque el pH de la orina depende de la alimentación del animal?



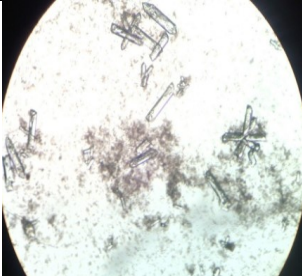




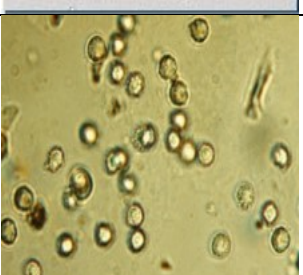
Examen microscópico

Método

En un tubo de ensayo poner de 12 a 15 mL de orina, centrifugar el tubo de ensayo con la muestra a 1500 revoluciones por minuto durante 5 minutos posteriormente decanta el líquido para que solo quede en el fondo del tubo el sedimento. En un portaobjetos limpio y desengrasado coloca una gota del sedimento urinario y cubre con un cubreobjetos, deja reposar por tres minutos y observa al microscopio compuesto con el objetivo de 10X y 40X.

Tabla 3.8 Cristales observados con microscopio compuesto 10X en el sedimento urinario

Cristal	Nombre	Cristal	Nombre
	Cristales de fosfato triple.		Cristales de fosfato triple
	Cristales de tirosina		Cristales de oxalato calcico

	Cristales de estruvita		Uratos amorfos
	Oxalato calcico		cristales de oxalato de calcio
	Cristales de fosfato amorfo		Sulfato de calcio
	Fosfato triple		Carbonato de calcio

Fuente: Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Práctica 4 Biometría Hemática

El laboratorio de análisis de será el lugar donde se realice la práctica, teniendo capacidad para un máximo de 15 estudiantes, quienes podrán formar equipos de 5 estudiantes cada uno.

Introducción

La sangre hace de 6-8% del peso corporal, la cual está compuesta de células (eritrocitos, leucocitos, plaquetas) que circulan en un líquido denominado plasma. Los eritrocitos o glóbulos rojos son los más numerosos, habiendo varios millones/mm³ de sangre; dependiendo de la especie, los eritrocitos pueden representar de un cuarto hasta la mitad del volumen sanguíneo total. Las plaquetas son el segundo tipo celular más numeroso con valores desde 100,000/mm³ en caballos a varios cientos de miles por mm³ en otras especies. El número total de leucocitos o glóbulos blancos es muy inferior a los de los eritrocitos o plaquetas, variando de 5,000/mm³ a aproximadamente 20,000/mm³; la proporción de tipos de leucocitos puede variar dependiendo de la especie, siendo los neutrófilos el tipo de leucocito más numeroso en los carnívoros y los linfocitos el más numeroso en los rumiantes (Meyer y Harvey 2007).

El plasma consiste principalmente en agua que contiene aproximadamente 6-88 g/dl de proteínas plasmáticas y 1,5 g/dl de sales inorgánicas, lípidos, carbohidratos, hormonas y vitaminas. El plasma se obtiene tomando la sangre con anticoagulante, seguido de una centrifugación; si se toma la muestra sin anticoagulante, el líquido que se obtiene tras la centrifugación se denomina suero (Meyer y Harvey 2007).

Obtención de la Sangre

La obtención de una muestra en buenas condiciones dependerá de la asepsia, la sujeción del paciente, la técnica para la extracción de sangre; así como también la manipulación y remisión de la muestra. Por estas razones se deben seguir ciertas normas básicas, como son las siguientes:

- a. Usar agujas, jeringas, recipientes; bien limpios y secos.
- b. Utilizar los métodos de sujeción apropiados según la especie animal con la que se trabaje.
- c. No producir estasis prolongado en la vena.
- d. No absorber la sangre con mucha rapidez, dejando que la sangre se deslice suave y lentamente.
- e. La sangre una vez extraída, se debe agitar suavemente para mezclar el anticoagulante con la sangre y evitar que se coagule .
- f. Mantenerla en refrigeración.

La cantidad de sangre que se puede extraer a un animal sin riesgo del mismo, varía en función de su tamaño o peso; así como también en dependencia a de la técnica que vaya a realizarse. Medway *et al.* (1973).

Cantidad de sangre que se sugiere extraer para la realización de la Biometría Hemática, según la especie animal.

- Bovinos: 3.5 – 5 mL.
- Equinos: 4 – 5 mL.
- Ovinos, Caprinos: 3 mL.
- Porcinos: 3 – 4 mL.
- Caninos de talla grande: 3 mL.
- Caninos de talla media y pequeña, Felinos: 1 – 2 mL.

Composición de la sangre

- Componentes celulares:
 - Eritrocitos
 - Leucocitos
 - Neutrófilos
 - Linfocitos
 - Eosinófilos
 - Basófilos
 - Monocitos

Contenido del Plasma

- Agua 91-92%
- Sólidos 8-9%

Componentes orgánicos sólidos

Proteínas (7%): se incluyen los anticuerpos y factores de coagulación, sustancias nitrogenadas, grasas neutras, fosfolípidos, colesterol, glucosa, enzimas, hormonas.

Contenidos inorgánicos sólidos 0.9% : (Na, Ca, K, Mg, P, I, Fe, Cu, HCO₃).

En Hematología el principal análisis o examen que se realiza, es la Biometría Hemática Completa o el Hemograma; siendo este la determinación cuantitativa y cualitativa de los diferentes componentes de la sangre, como son: los Eritrocitos, Leucocitos y Plaquetas, además de otros componentes como el Plasma y las Proteínas Plasmáticas.

Las diferentes técnicas que se realizan en el examen de la Biometría Hemática Completa, son las siguientes:

- Serie Roja: determinación de Hematocrito, determinación de hemoglobina, recuento total de eritrocitos y los Índices eritrocitarios
- Serie Blanca: Recuento total de leucocitos y leucograma
- Serie Plaquetar: Recuento total de plaquetas

– Determinación de proteínas plasmáticas

Tabla 4.1 Anticoagulantes usados en la toma de muestra de sangre para Hemograma

Anticoagulante	Concentración óptima	Preparación de los tubos	Ventajas	Desventajas
Mezcla de Oxalatos Amónico y Potásico	2 mg/ml de sangre	0.5 ml en un tubo, colocarlo en una estufa hasta su total desecación. Esto es suficiente para 5 ml de sangre	No altera los Hematíes	Después de la 1ª hora, se produce cariorrexis y graves cambios leucocitarios Interfiere las determinaciones de potasio, amonio, urea y fosfataasa alcalina Es venenoso; por lo que no puede utilizarse para transfusiones
Mezcla de Oxalato Potásico y Fluoruro Sódico	1 mg/ml de sangre	-----	Recomendado en análisis de Glucemia	No debe usarse cuando se valora la Glucosa o Urea por procedimientos enzimáticos Es venenoso; por lo que no puede utilizarse para transfusiones
Citrato Sódico	1 parte de anticoagulante por 9 partes de sangre		Idóneo para lo estudios de coagulación Puede usarse para transfusión	Interfiere con varias pruebas bioquímicas Previene la coagulación por pocas horas, arruga las células
Heparina	0.1–0.2 mg/ml de sangre	0.1 ml de sol. al 0.75% en un tubo y dejar evaporar hasta su desecación; o 1 gota de heparina comercial. Esto es suficiente para 5 ml de sangre	Preserva la sangre por 10 a 12 hrs Se aconseja para el estudio del valor de hematocrito Se emplea cuando se necesita plasma para determinaciones de Calcio, Sodio y Urea	Al emplearse en dosis demasiado altas, disminuye la apetencia tintorial de los Leucocitos La coagulación no se evita, sino que solo se retrasa 10-12 horas
Ácido Etilen Diamino Tetracético (EDTA)	1–2 mg/ml de sangre	Colocar en un tubo, 0.5 ml de sol. al 1% y dejar evaporar; o bien 1 gota de sol. al 10%. Esto es suficiente para 5 ml de sangre	Preserva bien la sangre en refrigeración por 24 horas, o a temp. ambiente por 6 horas	Concentraciones mayores de 2 mg/ml, provoca una salida de agua de los hematíes, y reduce el valor de hematocrito, produciendo también vacuolización de los neutrófilos

Fuente: Tomada del manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

Tabla 4.2 Código de color para tubos utilizados para toma de muestra de sangre

Código de Color	Aditivo	Mezclado	Área de Uso
Dorado Rojo	Activador de coagulación y gel separador	5	Bioquímica (suero). También como tubo de rutina, diagnóstico de enfermedades infecciosas en suero. Formación del coagulo en 30 minutos.
Rojo teja	Activador de coagulación con silicón	0/5	Bioquímica (suero). También como tubo de rutina, diagnóstico de enfermedades infecciosas en suero. Formación del coagulo en 60 minutos.
Azul real	Activador de coagulación (plástico) EDTAK2 (plástico)	8	Pruebas de elementos traza, toxicología y determinaciones en química nutricional.
Verde	Heparina de sodio / litio	8	Bioquímica (plasma)
Gris	Oxalato de potasio y Fluoruro de sodio	8	Glucosa
Lila	EDTAK3 líquido(vidrio) EDTAK2 (adherido por aspersión)	8	Hematología. También usado en inmunohematología
Azul claro	Citrato de sodio amortiguado	3 - 4	Determinaciones de coagulación.

Fuente: Tomada de la Guía de Tubos BD Vacutainer para Recolección Venosa (2012)

Figura 4.1 Tubos utilizados en la obtención de muestras sanguíneas

Fuente: Fotografía tomada de la Guía de Tubos BD Vacutainer para Recolección Venosa (2012)

Formula Roja

Determina los parámetros relacionados con el eritrocito. Se compone de los siguientes parámetros:

- a. Hematocrito (Ht): Es el porcentaje de la sangre que está compuesta por eritrocitos.
- b. Hemoglobina (Hb): Es determinada la cantidad de esta proteína expresada en g. /dL.
- c. Conteo eritrocítico (Eri): Es la cantidad total de eritrocitos circulantes por microlitro de sangre.

Formula Blanca

Determina los parámetros relacionados con los leucocitos.

Cambios que inciden directamente en la circulación de eritrocitos

Valor disminuido: Se denomina anemia, los tres parámetros disminuyen, aunque este decremento puede ser desproporcionado cuando existen cambios en el tamaño eritrocítico y/o la cantidad de hemoglobina contenida en ellos.

Valor aumentado: Denominado policitemia, donde aumenta el número de eritrocitos circulantes denominado policitemia absoluta, también puede darse un aumento transitorio en los eritrocitos circulantes denominado policitemia relativa.

Cambios en el volumen plasmático

Valor aumentado: Se presenta en estados de deshidratación.

Valor disminuido: Se presentan en sobrehidratación con fluidos administrados parenteralmente dando una lectura que simula anemia.

Índices eritrocíticos

Determinados mediante cálculos matemáticos

Volumen Globular Medio (VGM):

(Ht. x 10 / Eri). Es el tamaño eritrocítico expresado en femtolitros y se comporta de la siguiente forma:

- Valor aumentado: Se presenta en anemia macrocítica en la que la interferencia en la síntesis del ADN causa inhibición de la división celular y la resultante es la aparición de eritrocitos de gran tamaño (como ocurre en los casos de deficiencia de vitamina B12 y ácido fólico). También aumenta transitoriamente en los casos de reticulocitosis (anemia regenerativa).
- Valor disminuido: Se presenta en casos de deficiencia de hierro

Hemoglobina Globular Media (HGM)

(Hb. x 10 / Eri.), Se refiere a la cantidad de hemoglobina depositada en el eritrocitos expresada en picogramos.

- Valor aumentado: En los casos de hemolisis tanto in vivo como in vitro; la hemoglobina extracelular también está implícita, aunque el índice asume que toda la hemoglobina es intracelular por lo que se debe interpretar con reservas. Durante la reticulocitosis permanece normal o ligeramente elevado.
- Valor disminuido: En los casos de deficiencia de hierro.

Concentración de Hemoglobina Globular Media (CHGM)

(Hb x 100 / Ht) Es la cantidad de hemoglobina que está relacionada directamente con el eritrocito. Es el índice más preciso, ya que no requiere del conteo total de eritrocitos circulantes.

- Valor aumentado: En los casos de hemolisis tanto in vivo como in vitro, así mismo puede incrementarse en los casos de esferocitosis marcada.
- Valor disminuido: En los casos de reticulocitosis y deficiencias de hierro.

Morfología eritrocítica

Es determinada en el frotis sanguíneo

1. Rouleaux: Es el agrupamiento de eritrocitos a manera de monedas amontonadas, es debido a una tendencia de sedimentación en forma paralela, trastorno que se relaciona con el incremento en la concentración de fibrinógeno y/o el cambio en las concentraciones de globulinas. En caninos y felinos puede presentarse en condiciones normales en un grado moderado y es muy marcada en casos de enfermedad inflamatoria y neoplasias. En equinos sanos es común desapareciendo en casos de anemia.
2. Aglutinación eritrocítica: Cuando se forma un acumulo de eritrocitos, ocurre generalmente en los casos de anemias inmunomediadas, puede ser observada en las paredes del tubo colector como pequeños grumos.
3. Anisocitosis: Es la variación en el tamaño de los eritrocitos donde aparecen macrocitos y/o microcitos a lado de células de tamaño normales, se presenta como respuesta en anemias de tipo regenerativo.
 - Macrocitos: Son eritrocitos de gran tamaño que provocan incremento en el VGM, (reticulocitos) aparecen generalmente en anemias regenerativas.
 - Microcitos: Son pequeños eritrocitos con un VGM disminuido que son observados en casos de anemias dadas por deficiencia de hierro y piridoxina generalmente.

4. **Esferocitos:** Son considerados microcitos que cuentan con una membrana celular reducida, lo que incrementa la permeabilidad hacia el sodio, son casi exclusivos de caninos y se presentan generalmente en anemias de tipo autoinmune y en anemias hemolíticas isoimmune así como después de una transfusión. Son removidas rápidamente de la circulación por los macrófagos esplénicos, debido a su falta de elasticidad y a que no están habilitadas para traspasar los poros capilares esplénicos.
5. **Policromasia:** Es una variación en la afinidad eritrocítica hacia el colorante, donde existe un tono azulado en las células que contienen residuos de ARN, eritrocitos que generalmente son grandes y se consideran reticulocitos. La presencia de policromasia está asociada con el incremento de la actividad eritropoyética como respuesta a una anemia, catalogada como regenerativa cuando está presente.
6. **Hipocromia:** Se refiere a la presencia de palidez marcada en la región central del eritrocito dado por la disminución en la concentración de hemoglobina dentro de la célula, la causa más común en la que se presenta es la deficiencia de hierro.
7. **Poiquilocitosis:** Son células anormales en su forma comúnmente encontradas en anemias debidas a la pérdida crónica de sangre o a enfermedades caracterizadas por fragmentación eritrocítica, células que son retiradas prematuramente de la circulación agudizando el estado anémico. Los acantocitos, son un tipo de poiquilocitosis.
8. **Leptocitos:** Son células delgadas que cuentan con una membrana celular grande observadas en enfermedades crónicas debilitantes que producen anemia.
9. **Estomatocitos:** Son eritrocitos con una forma oval hacia el centro que se observa en la estomatocitosis hereditaria del Alaska malamut y en enfermedades hepáticas.
10. **Células en diana:** Son células con forma de tiro al blanco que se presentan en anemias de tipo regenerativo junto con policromasia, aunque cuando se presentan y no existe policromasia se pueden relacionar con enfermedad renal, hepática o esplénica.
11. **Cuerpos de Howell-Jolly:** Son remanentes nucleares observados frecuentemente como consecuencia de un estado anémico en procesos regenerativos, no obstante, si son numerosos pueden indicar hipoesplenismo.
12. **Cuerpos de Heinz:** Son estructuras localizadas en la membrana eritrocítica producto de la desnaturalización de la hemoglobina causada por la acción oxidante de ciertas drogas o químicos, estos cuerpos desorganizan la membrana eritrocítica y se asocian con hemólisis intravascular.
13. **Cuerpos eritrocíticos refráctiles:** Se localizan en estados normales en aproximadamente el 10% de los eritrocitos del gato, se incrementan en la presencia de diversas enfermedades, en muchas ocasiones juegan un papel importante en el desarrollo de la anemia.

14. Eritrocitos nucleados (Rubrocitos y Metarrubrocitos): Se deben a la liberación de células eritroides inmaduras hacia la circulación sanguínea en los casos de anemia, aunque pueden ser observadas en casos de enfermedad de la médula ósea donde existe daño en el parénquima que afecta la barrera capilar, así como en casos de leucemia.

Determinación de plaquetas

Son estructuras producidas por los megacariocitos en la médula ósea mediante el proceso de fragmentación citoplasmática, juegan un papel muy importante en la hemostasis, su variación puede ser:

Trombocitopenia: Disminución en el número de plaquetas circulantes, es el trastorno más común en los animales, generalmente acompañada con severos problemas de coagulación, se puede deber a: Destrucción plaquetaria que excede la producción ocurrida en trombocitopenias inmunomediadas (autoinmunes, isoimunes o inducidas por drogas), Lupus Eritematoso, hiperestrogenismo, Afecciones por Ehrlichia, enfermedad causada por Riketsia, o secuestro esplénico, así como neoplasias como hemangiosarcoma.

Fallas en la producción plaquetaria que ocurre en anemias aplásticas, enfermedad de la médula ósea y quimioterapia citotóxica. Además, la trombocitopenia puede dar un cuadro de coagulación intravascular diseminada, un síndrome que casi siempre acompaña a una enfermedad sistémica.

Trombocitosis: Incremento del número plaquetario. En el felino puede estar acompañando un proceso viral asociado a leucocitos con síndromes mieloproliferativos. Ocurre en procesos parasitarios donde intervienen parásitos succionadores de sangre y en casos de neoplasia. Usualmente acompaña a anemias por deficiencias de hierro.

Siempre que existan trastornos en la cuenta plaquetaria se debe considerar la determinación de parámetros que intervienen en la coagulación sanguínea. Enfermedades hemorrágicas en los animales están asociadas con la disminución en el número plaquetario, así mismo las alteraciones en la morfología del trombocito se observa en anemias regenerativas, desordenes mieloproliferativos en el felino y en otros trastornos en la médula ósea.

Alteraciones cuantitativas de la serie blanca

Dentro de las alteraciones cuantitativas en el número de glóbulos blancos se ha de diferenciar entre aquellas que afectan a toda la población leucocitaria (leucocitosis y leucopenia) y aquellas donde únicamente un subtipo celular es el que sufre un aumento o reducción en su número. Sin embargo, al ser los neutrófilos la población más numerosa en la sangre periférica, tanto de perro como de gato, la mayoría de las leucocitosis y leucopenias son consecuencia de una neutrofilia y neutropenia, respectivamente.

Tabla 4.3 Principales hallazgos, citológico y causas de los procesos más comunes que afectan a la serie blanca y plaquetas

Proceso	Hallazgos citologicos	Causas
Neutrofilia	Aumento del número de neutrófilos de manera pasajera.	Estrés (excepto gatos).
	Aumento del número de neutrófilos constante SIN desviación a la izquierda	Hiperadrenocorticismo
	Aumento del número de neutrófilos con desviación a la izquierda (granulocitos inmaduros) y/o cambios tóxicos (cuerpos de Döhle, Basofilia, granulación toxica, etc.	Infecciones localizadas
	Aumento persistente del número de neutrófilos con defectos funcionales en los mismos.	Proceso autosómico recesivo en el SETTER Irlandés
Neutropenia	Disminución del número de neutrófilos en la muestra	Inmunodeficiencia, infecciones víricas, infecciones bacterianas muy severas, fármacos mielosupresores, anorexia, pirexia, cuadros entéricos, etc.
Linfocitosis	Aumento del número de linfocitos siendo la mayoría linfocitos reactivos	Estrés (gato), infección crónica, reacción postvacunal, ehrlichiosis, hipoadrenocorticismo etc.
	Aumento muy marcado del número de linfocitos, siendo la mayoría linfoblastos. Células en mitosis, figuras aberrantes, etc.	Linfoma con fase leucémica, leucemia linfoide.
Linfopenia	Disminución del número de linfocitos en la muestra.	Hipercorticismo, estrés prolongado, infección vírica, aplasia medular, enteropatía con pérdida de proteínas, etc.
Monocitosis	Aumento del número de monocitos en la muestra.	Inespecífico. Acompaña a la neutrofilia. Proceso piogranulomatoso o que produzcan daño tisular extenso.
Eosinofilia	Aumento del número de Eosinófilos.	Procesos alérgicos, parasitaciones (en fases migrantes), leucemia eosinofílica, etc.
Basofilia	Aumento en el número de basófilos.	Ídem
Endotoxemia o sepsis por bacterias Gram (-)	Aparición de neutrófilos tóxicos (cuerpos de Döhle, Basofilia, vacuolizaciones, neutrófilos gigantes, neutrófilos con núcleo en anillo.	-
Anomalía de Pelger-Hüet	Todos los granulocitos hiposegmentados pero con la cromatina compactada	Defecto genético
Desviación a la derecha	Aumento del número de neutrófilos sobre todo a base de neutrófilos hipersegmentados.	Corticoterapia crónica, procesos crónicos muy purulentos.
Distemper canino	Cuerpos de inclusión de aspecto variable en neutrófilos, monocitos, linfocitos y eritrocitos.	Paramixovirus canino.
Ehrlichiosis canina	Estructuras morulares redondeadas en el citoplasma de monocitos y linfocitos. Trombocitopenia.	Ehrlichia canis, entre otros especies.
hepatozoonosis	Estructura incolora que desplaza el núcleo en neutrófilos y monocitos.	Hepatozoon canis.
Leucemia linfoblástica aguda	Linfocitosis con gran número de linfoblastos y células aberrantes. Neutropenia. Trombocitopenia y anemia arregenerativa	Proceso neoplásico, en gatos vinculado a FeLV.
Leucemia Linfocítica Crónica	Linfocitosis muy marcada con linfocitos de aspecto parecido a los normales. Neutropenia, trombocitopenia y anemia arregenerativa.	Proceso neoplásico
Leucemia granulocítica aguda	Leucocitos con formas tumorales inmaduras de granulocitos (mielocitos, metamielocitos, células bandadas, etc.)	Proceso neoplásico.
Leucemia mielomonocítica aguda.	Leucocitos con células tumorales que se asemejan a los monocitos.	Proceso neoplásico.
Trombocitopenia	Disminución del número de plaquetas en la muestra.	Procesos autoinmunes, inducida por fármacos, CID, infecciones víricas o por rickettsias, etc.
Trombocitosis	Aumento del número de plaquetas en la muestra.	Reactiva a anemia severa o por leucemia megacariocíticas.

Fuente: Tomada del manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

Neutrofilia

El aumento en el número de neutrófilos sanguíneos puede aparecer de manera fisiológica y por cortos periodos de tiempo en respuesta al estrés (a excepción del gato, donde este hecho provoca linfocitosis y no neutrofilia). De manera no fisiológica, la neutrofilia suele aparecer secundaria a infecciones o inflamaciones agudas, y de manera menos frecuente a niveles elevados de corticoides. Para dirimir la causa de la neutrofilia hemos de considerar si es continua o no (el estrés provoca picos de neutrofilia que desaparece en pocas horas), así como la existencia de cambios morfológicos en los neutrófilos (desviación a la izquierda y/o cambios tóxicos), los cuales son típicos de procesos infecciosos localizados y no ocurren en la neutrofilia por hipercorticismo.

De manera excepcional, en el Setter Irlandés existe un síndrome autosómico recesivo que cursa con neutrofilia y se acompaña por defectos funcionales en dichas células.

Neutropenia

Normalmente la neutropenia es la principal causa de leucopenia en pequeños animales y es característica de procesos que cursan con inmunodeficiencia (en la inmunodeficiencia felina la neutropenia es un hallazgo constante en animales infectados).

En este caso, al existir una aplasia medular, la neutropenia se acompaña de una caída en el resto de líneas celulares. Podemos encontrar neutropenia igualmente en cuadros de anorexia, pirexia y en cuadros gastroentéricos (es muy típica de infecciones por parvovirus tanto canino como felino).

También podemos observar neutropenia por el uso de fármacos con efecto mielosupresor y en determinados casos de leucemias mielocíticas agudas y síndromes mielodisplásicos (leucemia felina). En el caso de perros de raza Collie de capa gris plateada existe un proceso denominado hematopoyesis cíclica que cursa con fases de neutropenia seguidas por neutrofilias con desviación a la izquierda regenerativa. También en el Schnauzer Gigante, debido a malabsorción de vitamina B12, aparece neutropenia junto con hipersegmentación de los neutrófilos y anemia arregenerativa normocrómica y macrocítica. En el caso específico del gato, podemos encontrar animales con neutropenias leves (1.800 a 2.300/ μ L) durante largos periodos de tiempo sin que exista una causa patológica subyacente.

Linfocitosis

Es característica de tres procesos: neoplasias linfoides, infecciones crónicas con estímulo antigénico prolongado (leishmaniosis, babesiosis, ehrlichiosis) y secundaria a estrés en el caso del gato. Para poder diferenciar entre los dos primeros procesos se tiene que constatar si la población predominante es de linfocitos reactivos o de linfoblastos, para lo cual es fundamental la evaluación de la citología sanguínea. Respecto a la respuesta a estímulos antigénicos prolongados, cabe destacar que, sobre todo en el perro, las vacunaciones provocan una linfocitosis moderada durante el periodo posvacunal a base de linfocitos reactivos.

Igualmente, un animal con ehrlichiosis crónica muestra una linfocitosis muy marcada (aparte de otros síntomas en el frotis sanguíneo, como trombocitopenia). Por último, se ha descrito que el hipoadrenocorticismo felino cursa con linfocitosis.

Linfopenia

Es un hallazgo bastante común e inespecífico, y constituye uno de los hallazgos más frecuentes en cualquier animal hospitalizado o enfermo. Suele aparecer como consecuencia de un aumento de corticoides endógeno (típico leucograma de estrés, con neutrofilia y linfopenia) o exógeno, por estrés prolongado o por enfermedades víricas que conllevan aplasia medular (acompañándose de leucopenia generalizada), como por ejemplo en casos de parvovirus canina, moquillo, hepatitis vírica canina, peritonitis infecciosa felina, leucemia felina o inmunodeficiencia felina. También se describe en casos de enteropatía con pérdida de proteína, entre otros.

Monocitosis

De forma genérica es un hallazgo bastante inespecífico, y que normalmente acompaña a la neutrofilia. Se suele asociar a cuadros donde aparece un daño tisular muy extenso y grave o bien a procesos piogranulomatosos.

Eosinofilia

Principalmente es un hallazgo relacionado con procesos alérgicos o parasitarios. Por ejemplo, se describe una eosinofilia marcada en animales con dermatitis atópica por picadura de pulgas, complejo eosinofílico del gato, endoparasitosis gastrointestinales, etc. En el caso de los parásitos, únicamente observaremos eosinofilia durante la migración tisular de las formas parasitarias, y no existe cuando el adulto está libre en la luz intestinal. También aparece eosinofilia en las leucemias eosinofílicas, aunque éstas son raras en Medicina Veterinaria.

Basofilia

Es bastante rara y comparte etiología con la eosinofilia, ya que suelen cursar juntas. Puede encontrarse de manera secundaria a alergias, dirofilariosis, mastocitosis sistémica, leucemia basofílica, etc.

Leucemias

Bajo el término de leucemia se conoce un amplio rango de procesos, que tienen en común el hecho de que se trata de neoplasias que afectan a las células progenitoras sanguíneas. Pueden aparecer alteraciones tanto a nivel de la médula ósea como en sangre circulante.

Los dos subtipos más comunes en Veterinaria son las leucemias linfoides y las mieloides o mielocíticas (que a su vez se pueden subdividir según la población afectada en leucemias granulocíticas, monocíticas, megacariocíticas y eritrocíticas).

Es esencial el estudio citológico de sangre periférica a la hora de diagnosticar las leucemias así como para diferenciar leucemias mieloides de linfoides, cuyo tratamiento es totalmente diferente. Sin embargo, en todas ellas, se hace necesario acompañarlo con un estudio citológico de la médula ósea e incluso, a veces, para la correcta tipificación del proceso, se requieren estudios inmunocitoquímicos.

De forma general, podemos sospechar de un problema de leucemia cuando se observan figuras mitóticas, atípicas o bizarras en los leucocitos de una extensión sanguínea. Sin embargo, también existen leucemias que únicamente se presentan con un aumento persistente de un tipo celular sin que exista explicación evidente (por ejemplo, la leucemia linfocítica crónica).

La mayoría de los pequeños animales con leucemia presentan una leucocitosis persistente, tratándose la mayoría de leucocitos neoplásicos. El subtipo predominante dependerá del tipo de leucemia del animal. En la mayoría de los casos, esta leucocitosis a base de células neoplásicas se suele acompañar con una eritropenia y trombopenia, si bien, a veces, aparecen también alteraciones en estas líneas celulares (macroцитos, megatrombocitos, eritrocitos nucleados, etc.), lo cual indicaría una alteración generalizada en la médula ósea. Normalmente no se observan cambios tóxicos en los leucocitos neoplásicos.

Leucemias linfoides

Se debe considerar que hasta el 10% de los linfomas sólidos (sobre todo en la forma multicéntrica y usualmente en pacientes caninos) pueden provocar linfocitos leucémicos circulantes y, por tanto, compartir hallazgos citológicos con leucemias linfoides. Las leucemias linfoides más frecuentes en pequeños animales son la leucemia aguda linfoblástica (LAL) y la leucemia crónica linfocítica (LCL)

- Leucemia aguda linfoblástica (LAL). Afecta más frecuentemente a animales jóvenes o de edad media. Las células circulantes son del tipo linfoblasto con núcleos ovales e irregulares, cromatina reticular y una cantidad moderada de citoplasma basófilo. Se pueden distinguir igualmente uno o más nucléolos. Este tipo de leucemia es frecuente en felinos (asociada al virus de la leucemia felina) y más rara en perros. El hallazgo de estas células tumorales circulantes se acompaña de una anemia arregenerativa con neutropenia y trombocitopenia debido a que las células tumorales invaden la médula ósea.
- Leucemia crónica linfocítica (LCL). Las células circulantes son similares a linfocitos maduros, aunque suelen presentar citoplasma muy oscuro y de tamaño muy variable. Más llamativo que el cambio morfológico es sin duda el cuantitativo, pues dichas células son muy numerosas. El animal presentará leucocitosis con linfocitosis y neutropenia y debido a la acción tumoral en la médula ósea, anemia arregenerativa y trombocitopenia. Este proceso aparece tanto en el perro como en el gato (en este último no suele estar asociado a FeLV).

Leucemias mieloides

Entre las leucemias mieloides, las más comunes son las agudas. Según la línea celular afectada se pueden diferenciar varios procesos:

- Leucemia aguda granulocítica. Predomina en animales jóvenes, sobre todo en el perro. Se caracteriza por leucocitosis grave, conformada por numerosas formas inmaduras parecidas a mieloblastos, neutrófilos bandados gigantes y metamielocitos. Se pueden observar células aún más inmaduras que presentan una cromatina muy poco compacta con un citoplasma amplio y granulado eosinofílico.
- Leucemia aguda mielomonocítica. Las células leucémicas presentan características típicas de los monocitos. Es la más frecuentemente descrita entre las leucemias mieloides en el gato.
- Mielosis eritrémica o eritroleucemia. En este tipo de leucemia la serie roja es la tumoral. Es un proceso más común en el gato que en el perro y cursa con una anemia no regenerativa grave y un elevado número de eritrocitos nucleados circulantes. A veces se acompaña de anisocitosis (macrocitosis).
- Unos procesos muy relacionados con las leucemias mieloides son los síndromes mielodisplásicos. Estos síndromes cursan con citopenias y anomalías en la maduración de una o varias líneas celulares. A excepción del gato (por infección con virus de la leucemia felina o virus de la inmunodeficiencia felina), estos procesos mielodisplásicos son raros en Veterinaria.




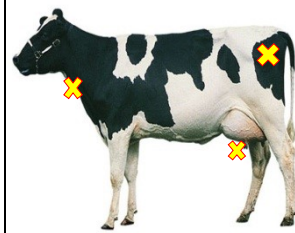
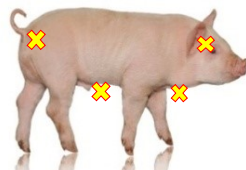

Obtención de la muestra sanguínea para biometría Hemática

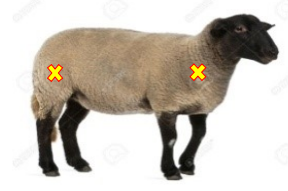

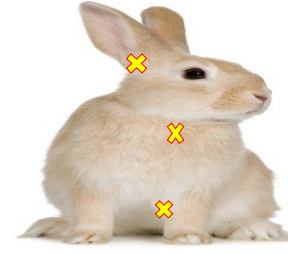


Figura 4.2 Toma de muestra sanguínea en un canino



Fuente: Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Tabla 4.4 Sitios de venopunción para toma de sangre por especie animal

Especie	Sitios Venopunción	Calibre Aguja	Pulgadas	Especie
Canino	Vena yugular externa Vena safena Vena cefálica Vena femoral	23G – 21G	1±1.5	
Felino	Vena yugular Vena femoral Vena cefálica	25G – 23G	1	
Equino	Vena yugular	16G ± 18G ± 21G	1.5	
Bovino	Vena yugular Vena caudal o coccígea Media vena mamaria	16G ± 18G ± 21G	1.5	
Porcino	Vena cava anterior Vena superficial de la oreja Vena coccígea Vena subcutánea abdominal	18G ± 21G	1	
Caprino	Vena yugular Vena caudal	18G ± 21G	1.5	

Ovino	Vena yugular Vena caudal	18G ± 21G	1.5	
Ave	Vena radial	21 - 27	1.0	
Conejo	Punción cardiaca Vena yugular Vena auricular	19– 23	2.0	
Hámster	Punción cardiaca Seno retroorbitario	22– 25	1.5	
Cuy	Punción cardiaca Seno retroorbitario	22-25	2.5	

Fuente: Información tomada del manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

Objetivos

El alumno tenga los conocimientos para interpretar los valores sanguíneos y diferenciar los distintos tipos de anemias.

Procedimiento

Material

- Jeringas de 3 ml - 5 ml
- Tubo con EDTA (tapón morado)
- Torniquete

- Desinfectante

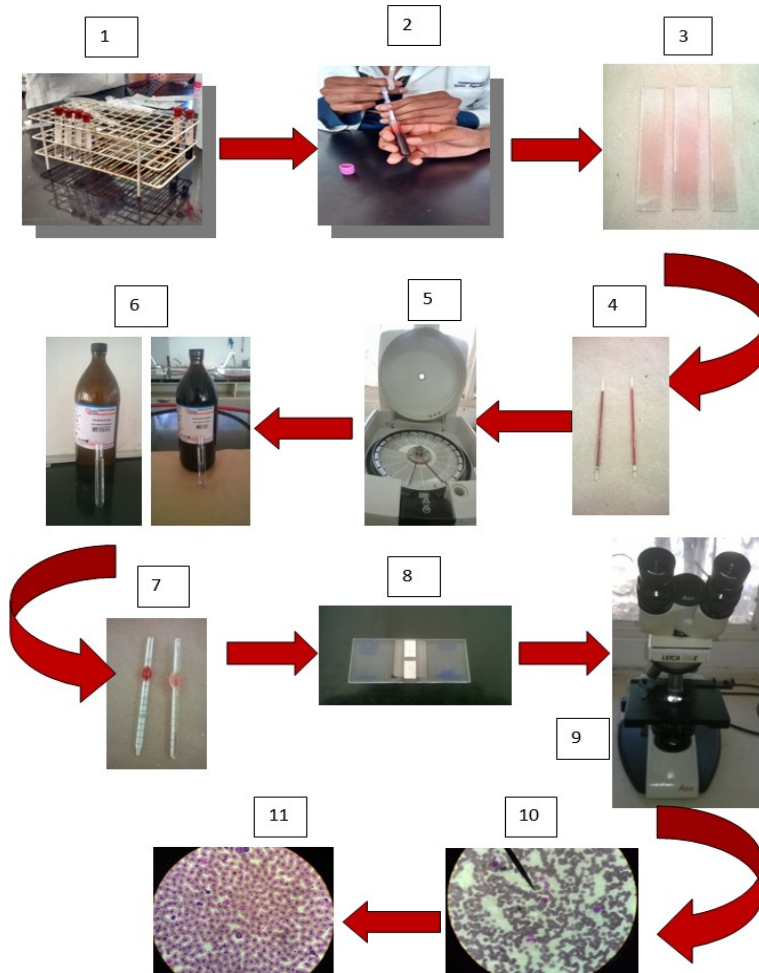
Toma de muestra: Ver (figura 4.2.)

Se colecta la muestra usando el tubo correspondiente, hacer movimientos suaves para homogeneizar la sangre con el anticoagulante y dejar el tubo en la gradilla de plástico.

Desarrollo de la práctica

- 1 cámara de Neubauer
- 1 pipeta para glóbulos rojos
- 1 pipeta para glóbulos blancos
- 4 portaobjetos
- 2 tubos capilares
- 1 pipeta Pasteur
- Solución salina isotónica
- Solución buffer
- Colorante de Wright
- Aceite de inmersión
- 1 boquilla
- Diluyentes para conteo de glóbulos rojos y blancos.
- 1 microscopio
- 1 microcentrífuga
- Muestra Biológica: 5 ml de sangre venosa

Figura 4.3 Fotografías que indican los pasos a seguir para la realización de la Biometría hemática



Fuente: Orozco, María (2016). Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Descripción de metodología

1. Fotografía que muestra los tubos con muestra sanguínea colocados en una gradilla.
2. Fotografía donde se observa la forma correcta de tomar con una pipeta Pasteur una gota de sangre para realizar el frotis sanguíneo.
3. Fotografía que muestra los frotis sanguíneos que se hicieron como se describe a continuación.
 - Una vez homogenizada la muestra, se toma sangre con una pipeta Pasteur.
 - Se deposita una gota pequeña sobre un extremo del portaobjetos para, el cual debe descansar en una superficie plana.
 - Se apoya el extremo del portaobjeto extensor sobre la superficie del portaobjetos para frotis, y por delante de la gota de sangre.
 - Se hace retroceder el portaobjetos extensor hacia la gota de sangre, sin separarlo de la superficie del portaobjetos para frotis.

- Una vez el portaobjetos extensor haya hecho contacto con la sangre, se inclinara, de modo que ambos formen un ángulo de 30-45 grados.
- Cuando la sangre haya corrido por capilaridad, se procede a la extensión.
- Con un movimiento rápido continuo y uniforme, se extiende el portaobjetos extensor hacia delante, cubriendo 2/3 del portaobjetos para frotis.
- Séquese rápidamente moviéndolo en el aire.
- 4. Fotografía de los hematocritos ya con la muestra de sangre que se realizo como se describe a continuación.
 - Homogenizar la muestra en el tubo de ensayo suave y uniformemente.
 - Tomar la muestra con el capilar azul, la cual entrara por simple capilaridad; llenando aproximadamente el 80% o $\frac{3}{4}$ partes del capilar.
 - Ocluir un extremo del capilar con la flama del mechero.
 - Centrifugar a 2000-2500 r.p.m. durante 10 minutos.
- 5. Fotografía de la Microcentrifuga para hematocito.
- 6. Líquidos de Turk y Hayem diluyentes utilizados para el llenado de pipetas de glóbulos blancos y rojos. respectivamente.
- 7. Fotografía que muestra la forma correcta del llenado de las pipetas de glóbulos blancos y rojos .como se describe a continuación.
 - Para globulosos rojos. Se trabaja con una dilución de sangre 1:200, para lo cual se toma sangre hasta la marca 0,5 y de Sol. de Hayem hasta la marca 101 de la Pipeta de Thomas para Glóbulos Rojos.
 - Limpiar la punta de la pipeta después de aspirar cada líquido; así como también, evitar la formación de burbujas.
 - Agitar vigorosamente la pipeta, en posición horizontal, ocluyendo ambos extremos, durante al menos 2 minutos.

Se llevara la cámara al microscopio y se esperara de 2-3 minutos para que se produzca la sedimentación de las células y llevar a cabo el conteo

Para glóbulos blancos

- Se trabaja con una dilución de sangre 1:20, para lo cual se toma sangre hasta la marca 0,5 y de Sol. de Turk hasta la marca 11 de la Pipeta de Thomas para Glóbulos Blancos.
- Limpiar la punta de la pipeta después de aspirar cada líquido; así como también, evitar la formación de burbujas.
- Agitar vigorosamente la pipeta, en posición horizontal, ocluyendo ambos extremos, durante al menos 2 minutos.
- 8. Cámara de Neubauer que se utiliza para hacer el conteo de glóbulos blancos y rojos., se describe a continuación como llenar la cámara
- 9. Se procede al llenado de la cámara de neubauer descartando las primeras 2-3 gotas; tras ello secamos la punta de la pipeta y se coloca la pipeta en un ángulo de 45° grados, controlando la salida de líquido, dejando que el líquido llene el espacio entre el cubre y la cámara, por capilaridad del líquido.
Microscopio compuesto con el que se realiza el conteo de los glóbulos blancos y rojos así como del conteo diferencial de glóbulos blancos.

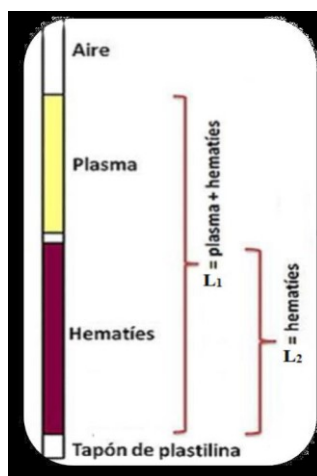
10. Fotografía que muestra la tinción del frotis sanguíneo con el colorante de Wright para realizar el conteo diferencial de glóbulos blancos.

Cálculo de Resultados

Determinación del hematocrito

Indica la relación entre el volumen de los eritrocitos y el de la sangre total. Es la prueba orientativa más valiosa en las situaciones de anemia, sencilla de realizar; y debe hacerse en las primeras 5 horas después de recogida la sangre. Existen 2 métodos, el Macrométodo (Método de Wintrobe) y el Micrométodo (Microhematocrito); de los cuales el Microhematocrito es el que se utiliza en la actualidad, por su facilidad y rapidez (Messeguer *et al.* 1992).

Figura 4.4 Representación gráfica de hematocrito. L1 y L2



Fuente: Tomada del manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

$$\text{Hematocrito } \% = \frac{L_2}{L_1} * 100 \quad (4.1)$$

$$\text{Hemoglobina } \left(\frac{g}{dl}\right) = \text{Hto}(\%) / 3 \quad (4.2)$$

Volumen Corpuscular Medio (V.C.M.)

Expresa el promedio de los volúmenes individuales de los eritrocitos, se mide en Femtolitros (Fl) y se calcula según la fórmula siguiente:

$$\text{VCM} = \text{Hematocrito}(\%) \times \frac{10}{n^\circ \text{ de hermaties}} \quad (4.3)$$

Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular (C.M.H.C.)

Es la concentración de hemoglobina que, por término medio, posee el eritrocito o el peso de la hemoglobina y el volumen en que esta contenido; se expresa en porcentaje o en gr/dl. Se calcula según la fórmula siguiente:

$$CMCH = Hemoglobina(gr/dl) \times \frac{100}{Hematocrito(\%)} \quad (4.4)$$

Hemoglobina Media Corpuscular (H.M.C)

Expresa el peso de hemoglobina por eritrocito, se mide en Picogramos (Pg) y para calcularla utilizamos la siguiente fórmula:

$$HCM = Hemoglobina \left(\frac{gr}{dl} \right) \times \frac{100}{n^{\circ} de hematies} \quad (4.5)$$

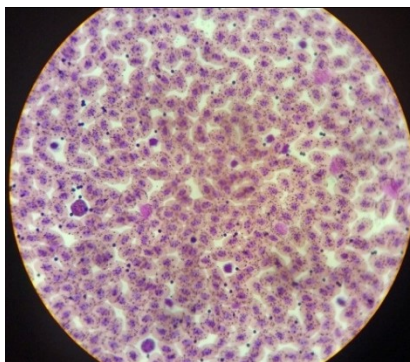
El Frotis Sanguíneo

Permite el estudio cualitativo de los diferentes componentes sanguíneos, ya sea por cambios morfológicos (eritrocitos, leucocitos y/o plaquetas), inclusiones intra o extracelular de parásitos o bacterias sanguíneas; así como también la estimación de recuentos indirecto de las plaquetas, y la valoración de la formula diferencial de leucocitos.

- Comprobar el Recuento Diferencial de Leucocitos.
- Evaluar la presencia de Anormalidades Morfológicas en los Leucocitos.
- Estimar el número de Plaquetas promedio en sangre, a través de los Métodos Indirectos.
- Evaluar la presencia de Anormalidades en la Morfología Plaquetar.
- Evaluar la Morfología de los Eritrocitos, en cuanto a: Tamaño, Color, Forma, Aparición de Hematíes Inmaduros, Presencia de Inclusiones en los Hematíes, entre otros.

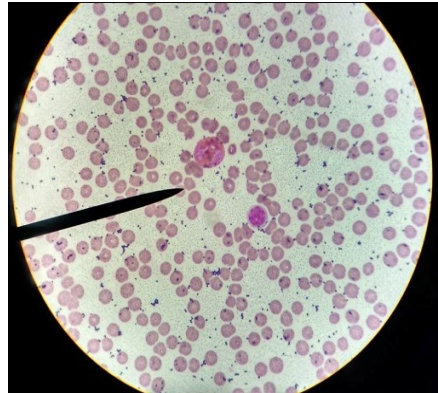
Resultados

Figura 4.5 Glóbulos rojos de Aves. Los eritrocitos tienen forma elíptica y son (Nucleados). Frotis teñido con Wright



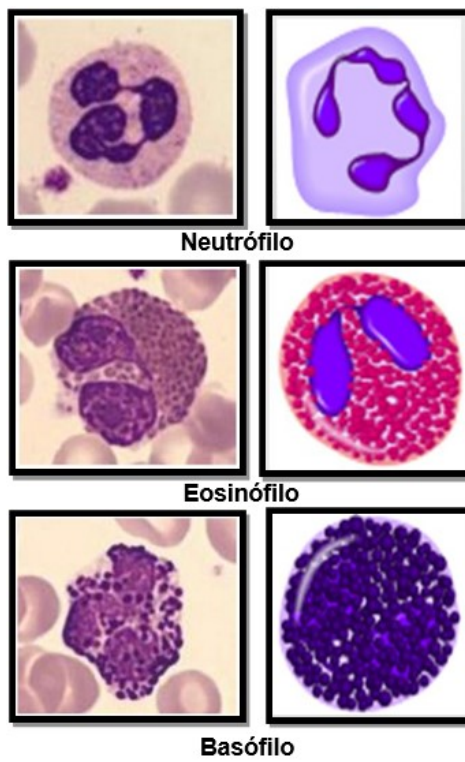
Fuente: Fotografía tomadas con cámara de teléfono móvil, en práctica de laboratorio

Figura 4. 6 Glóbulos rojos de mamífero. Los eritrocitos no tienen núcleo. Frotis teñido con Wright

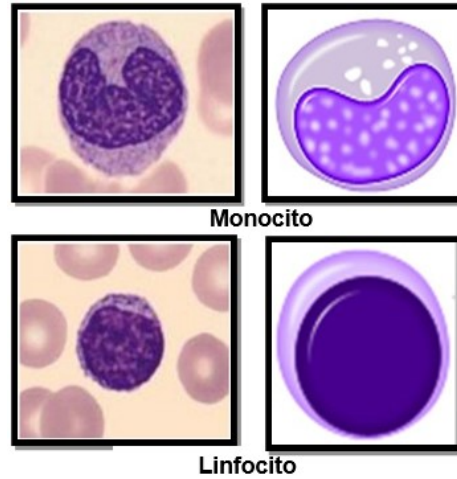


Fuente: Fotografía tomadas con cámara de teléfono móvil, en práctica de laboratorio Mamíferos (Anucleado)

Figura 4.7 Granulocitos (Granulados por presencia de Lisosomas)

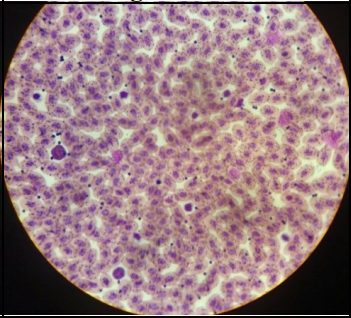

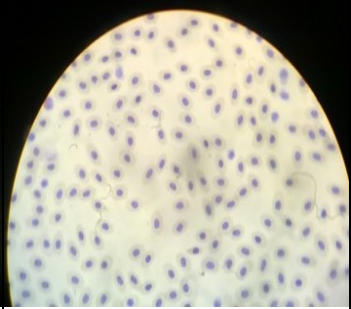



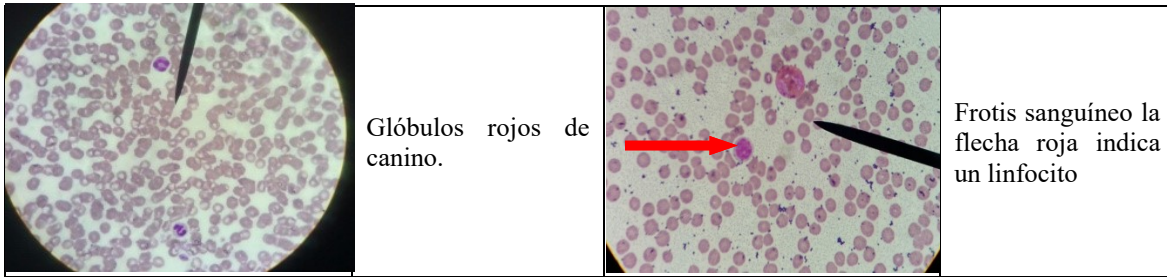
Fuente: Del manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

Figura 4.8 Agranulocitos

Fuente: Del manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

Tabla 4.5 Células sanguíneas teñidas con colorante de Wright observados con microscopio compuesto con objetivo de 100X

Frotis sanguíneo	especie	Frotis sanguíneo	especie
	Glóbulos rojos de ave. se observan los eritrocitos nucleados.		Frotis sanguíneo la flecha indica un neutrófilo.
	Glóbulos rojos de tilapia. se observan Los eritrocitos son nucleados		Frotis sanguíneo la flecha roja indica un eósinofilo.



Fereferencias Orozco, María (2016). Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Práctica 5 Aislamiento y cuantificación de microorganismos a partir de muestras ambientales (agua)

Introducción

Los microorganismos desempeñan un papel más importante en el ambiente, de lo que podrían sugerir sus dimensiones tan pequeñas. Cada microorganismo en un ecosistema interactúa con su entorno, modificando marcadamente en algunos casos, las características del ecosistema.

Las funciones de los microorganismos pueden ser de síntesis y degradación de compuestos químicos. Algunos microorganismos son autotróficos, es decir, capaces de generar materia orgánica a partir de CO₂. En tanto que otros son organotrofos y participan en la biodegradación y reciclado de materia orgánica e inorgánica. Los microorganismos participan en los ciclos biogeoquímicos, transformando elementos del medio que les rodea, esto mediante reacciones de oxidación-reducción; y para muchos organismos como las plantas, son los únicos agentes biológicos capaces de regenerar las formas básicas de los elementos (C, O, H, N, P y S) que son necesarios para su nutrición.

Los hábitats naturales de los microorganismos son muy variados. Habitan el suelo, agua, la superficie de organismos superiores y el interior de plantas y animales. Las condiciones del medio ambiente afectan las condiciones de vida de los microorganismos. De esta forma la temperatura, el pH, la disponibilidad de agua y el oxígeno, juegan un papel determinante en el tipo y cantidad de cada uno de los microorganismos en determinado ecosistema. Sin embargo, en términos generales es la concentración y tipo de nutrientes lo que finalmente definirá los tipos y cantidad de microorganismos existentes.

El término *microambiente*, describe el lugar donde vive un microorganismo. Lo que puede parecer un ambiente uniforme, por ejemplo, una migaja de tierra, en realidad puede tener diferentes microambientes química y físicamente distintos. Las condiciones fisicoquímicas en el microambiente pueden cambiar con rapidez, por ello los microambientes son heterogéneos y las condiciones en un microambiente determinado pueden variar rápidamente; esto explica el que se encuentren microorganismos fisiológicamente diferentes (aerobios, anaerobios, fotótrofos, autótrofos, etc) en la misma pequeña muestra de tierra lodo o agua.

Propósito específico de la práctica

Al realizar esta práctica te darás cuenta de la gran diversidad de microorganismos que se pueden encontrar en cualquier muestra ambiental. Además pondrás en práctica algunos métodos para contar el número de microorganismos.

Desarrollo de la práctica

Objetivos

- Demostrar la presencia de diferentes microorganismos en una muestra de agua

- Determinar el número de bacterias mesofílicas aerobias en una muestra de agua.

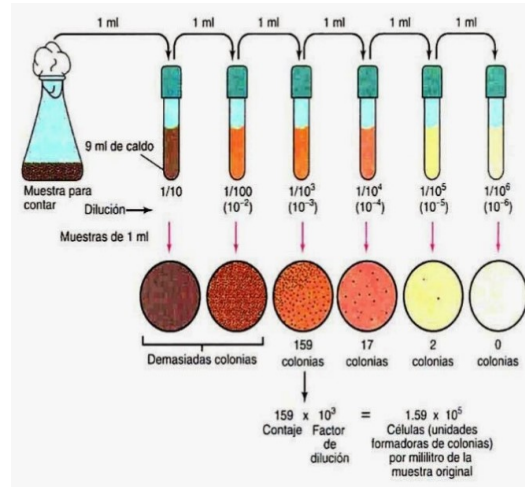
Material

- Muestra de agua (pozo, tinaco, filtro, etc).
- 3 cajas de Petri estériles
- Agar para métodos estándar fundido a 45°C.
- 2 Tubos con 9 mL de solución salina fisiológica.
- 3 pipetas estériles de 1 mL
- Marcador permanente.
- Contador de colonias Québec.

Método

1. Tomar 1 mL de la muestra de agua y depositar en una caja de Petri estéril. Rotular esta caja como muestra directa.
2. Tomar 1 mL de la muestra de agua con una pipeta estéril y depositarla en el tubo de ensayo que contiene 9 mL de solución salina estéril, agitar fuertemente y rotular como dilución 1/10.
3. De la dilución 1/10 tomar 1mL con pipeta estéril ly depositarla en otro tubo que contiene 9 mL de solución salina estéril, agitar fuertemente y rotular como dilución 1/100.
4. Continuar con el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución 1/1000,000
5. Tomar de cada dilución 1mL. y depositarlo en una caja de petri estéril y agregar 15 mL de agar para métodos estándar fundido a 45°C, homogenizar con movimientos rotatorios suaves. y dejar solidificar en la mesa de trabajo.
6. Hacer el mismo procedimiento para cada dilución
7. De tal forma que al final tendrás las siguientes cajas 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10,000, 1/100,000 y 1/1000,000 Dejan enfriar para que solidifique el medio.
8. Incubar a 37-40°C, durante 24 a 48 horas en la estufa bacteriológica.
9. Revisar el crecimiento de colonias , y contar las UFC en la dilución que mejor te permita contar para eliminar el error.
10. Calcular el número de unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL), tomando en cuenta el factor de dilución.
11. El resultado se reporta como UFC/mL de muestra analizada.

Figura 5.1 Esquema que ejemplifica las forma de diluir e inocular la muestra de agua



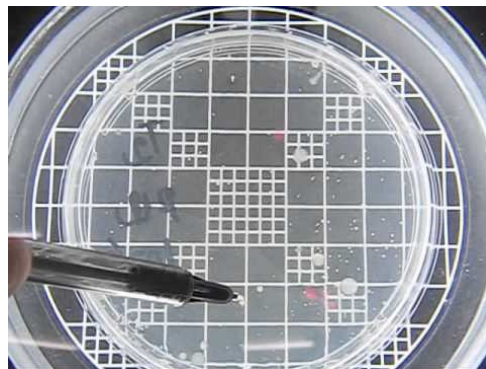
Fuente: Fotografía del libro. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas Koneman

Figura 5.2 Cajas de cultivo con crecimiento de colonias bacterianas de la muestra de agua de bebedero de los cerdos



Fuente: Orozco, María (2016). Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Figura 5.3 Cuenta colonias Quebec para el conteo de unidades formadoras de colonias en caja de petri



Fuente: Orozco, María (2016). Fotografías tomadas con cámara de teléfono móvil. en práctica de laboratorio UAMVZ

Cuestionario:

1. Investigue cuales son los tipos de microorganismos que predominan en el aire, en la tierra y en el agua. Señale el nombre incluyendo género y especie.
2. Explique la importancia de realizar diluciones de la muestra para el conteo de las colonias.
3. Haga un cuadro comparativo y registre los valores obtenidos en el conteo de cada placa contada según la muestra correspondiente.

Práctica 6 Examen de piel

La piel es el mayor de los órganos del cuerpo y realiza varias funciones vitales destinadas a mantener el estado homeostático del organismo. Entre las principales funciones de la piel se encuentran:

Tabla 6.1

Función	Serie de actividades
Barrera	Control de la pérdida de agua, electrolitos, etc. Exclusión de agentes químicos, físicos y biológicos
Sensación	Calor, frío, dolor, picor y presión
Regulación de la temperatura	Aislamiento, variación del flujo sanguíneo y sudación
Control Hemodinámico	Cambios vasculares periféricos
Secreción, Excreción	Función glandular, crecimiento folicular y epidérmico. Pérdida percutánea de grasas, lípidos y solutos
Síntesis	Vitamina D.
Función Inmune	Vigilancia, respuesta

Fuente: Locke *et al.* (1999)

La piel está compuesta por 3 capas, la Epidermis, Dermis y Subdermis; las cuales tienen composición y funciones determinadas. Además también está compuesta por sus derivados como son; el Pelo y las Glándulas Cutáneas (Lamping y García 1996)..

Epidermis

Que forma la capa superficial, y por tanto sometida a diferentes factores químicos, físicos y biológicos. Por tanto, debe proteger su integridad mediante la secreción continua de componentes protectores, como son el pelaje, células queratinizadas del estrato corneo y las secreciones de las glándulas cutáneas.

Dermis

Es el mayor de los componentes estructurales de la piel. Aporta una matriz de estructuras y secreciones que sirven de soporte y mantienen una interacción con la epidermis y sus anejos. Incluye tejido conectivo, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y receptores, y componentes celulares. Cumple un importante papel en la termorregulación y sensibilidad (Lloyd 1992).

Subdermis

Compuesta de tejido conjuntivo en el cual se acumulan, reservas de grasa subcutánea; la subdermis no existe en los labios, nariz, morro, cejas y otros lugares en los que penetran las asas musculares en el corion. Reviste de importancia ya que permite el deslizamiento de la piel sin que se desgarre (Lamping y García 1996).

El Pelo

Consta de 3 partes; la Raíz del Pelo que se encuentra en el espesor de la piel, el Tallo del pelo la cual es la parte libre que sobresale de la superficie epidérmica y la porción terminal a la que se le denomina Vértice del Pelo.

La Raíz

Se aloja en el folículo piloso, cuya pared consta de las vainas epiteliales interna y externa, y la bolsa conjuntiva pilosa; en cada folículo piloso existe un musculo, cuya contracción eriza el pelo. Según Lamping y García (1996) por la longitud, grosor, resistencia, elasticidad y región corporal que ocupan se pueden distinguir varios tipos de pelo; como son: Pelos de Cubierta, Pelos Vellosos o Lana, Pelos Largos, Cerdas, Pelos Táctiles o Sinuales, Pelos Sensibles, Pelos Defensores (Vellosidades).

Glándulas Cutáneas

La piel incorpora diversas glándulas exocrinas tubulares y alveolares que pueden emerger en el folículo piloso (glándulas pilosebáceas o epitriquiales) o independientemente, en la superficie cutánea de zonas glabras (glándulas atriquiales o libres).

Glándulas Sudoríparas

Aporta humedad que ayuda en la protección contra la fricción, mantener la flexibilidad de la piel, excreción de productos de deshecho, defensa química a través de la producción de sustancias. Las sales y proteínas presentes proveen de una fuente de nutrientes para la microflora de la piel y contribuyen en el efecto del tampón del pH cutáneo. Esta secreción, solamente tiene importancia en la función de termorregulación en los equinos, bovinos y algunos primates.

Glándulas Sebáceas

Mayores en áreas con baja densidad de folículos pilosos y se hallan en mayor número en las uniones mucocutáneas, espacios interdigitales, en el dorso del cuello, en el mentón y en el dorso de la cola (glándula de la cola). Colabora en la formación de la barrera cutánea, protegiendo contra la proliferación e invasión de microorganismos patógenos a través del estrato corneo y del folículo piloso. Contribuye conjuntamente con el sudor en el mantenimiento y control de la flora normal de la piel, ayuda en el control de la pérdida de agua y mantiene flexibilidad cutánea.

Aunque una historia y un examen clínico completo son esenciales para un caso dermatológico, las investigaciones a través de exámenes complementarios son de importancia fundamental para alcanzar un diagnóstico definitivo. Entre los procedimientos diagnósticos preestablecidos en Dermatología incluyen: Muestras de Pelo, Raspados Cutáneos, Citología de Extendidos y Aspirados, Tricogramas, Examen con Lámpara de Wood, Cultivos de Hongos, Biopsias de Piel y Cultivos Bacteriológicos.

Otros procedimientos diagnósticos especializados incluyen Pruebas Intradérmicas, Pruebas Alérgicas *in vitro* y pruebas de parches. Procedimientos como Prueba de Fluorescencia, Raspados Cutáneos, Tricogramas, Cultivos de Hongos, Citología de la Piel, pueden ser realizados dentro de la clínica; mientras que Cultivos Bacteriológicos, Identificación y Pruebas de Sensibilidad, Pruebas Alérgicas In Vitro, Biopsias e interpretación requieren instalaciones y personal calificado. Dependiendo de la información obtenida, algunas interpretaciones frecuentemente requieren a un patólogo clínico.

La Dermatofitosis se caracteriza por lesiones redondas con alopecia, eritema, reacciones inflamatorias. Son causadas por un grupo de hongos queratinofílicos, llamados Dermatofitos, caracterizados por su parasitismo, que prefiere el epitelio queratinizado, pelo y uñas. Existen 22 especies de dermatofitos patógenos que pertenecen a los géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. Los dermatofitos patógenos para los animales se encuentran en los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*. (Medway *et al.* 1973).

La mayor parte de los Dermatofitos ofrece un cuadro clínico que evidencian al agente causal de la enfermedad:

- En Caninos: se muestran lesiones circulares con pérdida de pelo o pelos frágiles quebrados cubiertos de escamas o costras; generalmente en la cabeza, aunque también pueden ocurrir en el cuerpo, extremidades o la cola. En ocasiones la lesión puede estar completamente expuesta y libre de escamas.
- En Felinos: lesiones circulares sin pelo y cubierta de escamas, por regla general en la cabeza. Pueden darse infecciones sin lesiones visibles, que solo es posible reconocer con la Lámpara de Wood y Cultivo.
- En Equinos: lesiones circulares o de forma irregular, con pérdida de pelo acompañada de espesas costras grises, ubicadas en áreas en que la silla o la brida rozan la piel, o a veces en la cabeza
- En Bovinos: lesiones circulares sin pelo cubiertas de costras grises espesas, localizadas en la cabeza o cuello.

Características Microscópicas de los Dermatofitos

Los dermatofitos aparecen como entidades morfológicas definidas y no deben ser confundidas con burbujas de aire, gotas de grasa, etc. Se observan en las costras o dentro de los tallos del pelo cerca de la porción basal de la raíz, como elementos miceliales, estrechamente tabicados, hialinos; o como cadenas o vainas de esporas (artrosporas) en la superficie externa del pelo. El tamaño de la espora varía con la especie de dermatofitos. Las artrosporas de las especies de *Microsporum* tienden a ser más pequeñas que las especies de *Trichophyton* (Medway *et al.* 1973).

Los *Trichophyton* poseen forma alargada, en forma de cigarro de habano, pared lisa y tiene microconidas de forma variada; mientras que los *Microsporum* tienen macroconidios fusiformes con ornamentación en la superficie (McCurnin 1987).

Método de Examen Directo

El examen microscópico puede confirmar la presencia de dermatofitosis y servir como guía para encontrar el organismo infectante. Si aparecen pelos fluorescentes se debe proceder a hacer el examen, si no aparecen; pero se tiene sospecha, se eligen los pelos deslustrados y partidos o los que presentan en su base un collarito blanco grisáceo (Benjamín 1962).

Técnica para Identificación Directa

Materiales

- Muestra
- Cubreobjeto
- Portaobjeto
- Pipeta de Pasteur plástica
- Solución de Hidróxido de Potasio 10% (KOH)
- Mechero de Bunsen
- Microscopio

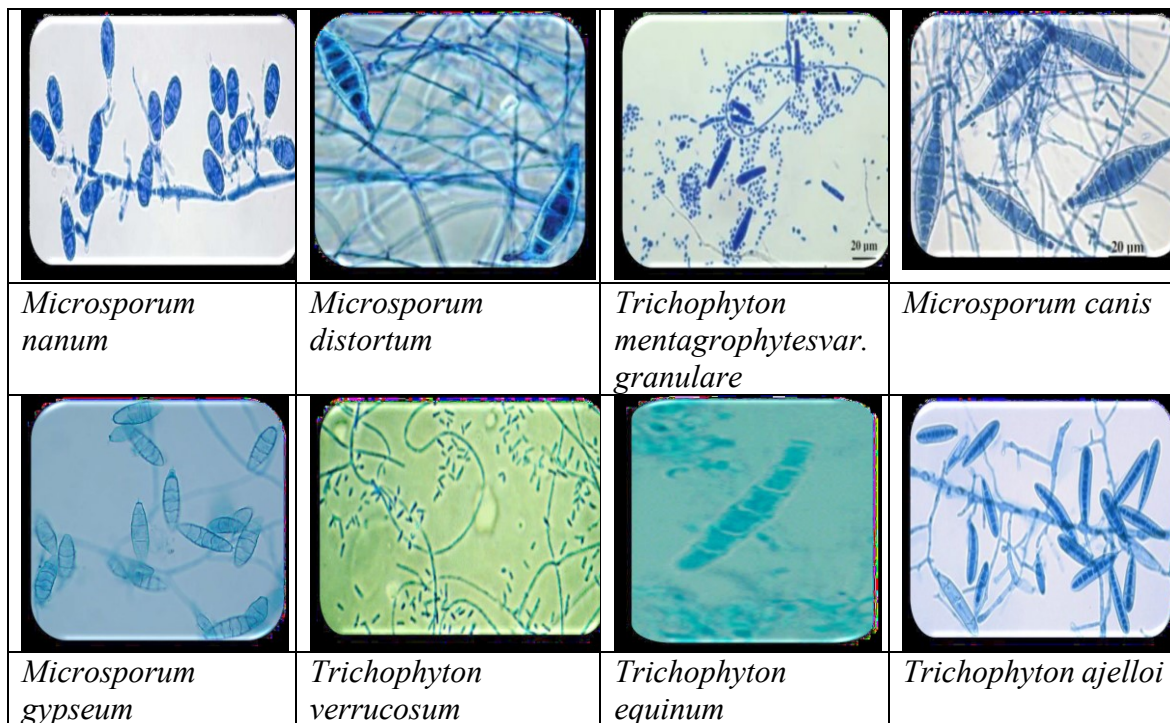
Procedimiento

1. Se coloca la muestra de pelos y raspaduras de piel, sobre el portaobjeto; agregue 1 a 2 gotas de Hidróxido de Potasio (KOH) al 10%, el cual cumple su función como agente aclarador. Si la muestra está muy costrosa, se debe triturar primero. Los pelos pigmentados se blanquean mediante Peróxido de Hidrogeno 3% antes de agregar el KOH.
2. Se coloca el cubre objetos, evitando la formación de burbujas; es conveniente sellar los bordes del cubreobjeto usando parafina para evitar la evaporación durante el examen.
3. Se aplica calor suave bajo el portaobjetos, manteniéndolo unos segundos sobre una llama o apoyar el portaobjetos sobre la lámpara del microscopio durante corto tiempo. De no hacer uso de calor dejar reposar la muestra durante 20 a 30 minutos.
4. Examinar al microscopio bajo luz tenue, primero a bajo aumento (10X) para búsqueda de pelos anormales, engrosados con bordes irregulares o que contengan artrosporas.
5. Los pelos sospechosos se examinan a objetivo 40X, para ver los detalles de las esporas e hifas, sobre los pelos (ectotrix) o en el interior de ellos (endotrix).

Tabla 6.2 Principales Especies de Dermatofitos de los Géneros *Microsporium sp.* y *Trichophyton.*

Genero.	<i>Microsporium sp</i>	<i>Trichophyton sp.</i>
Especies	<i>M. canis</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
	<i>M. gypseum</i>	<i>T. verrucosum</i>
	<i>M. nanum</i>	<i>T. equinum</i>
	<i>M. distortum</i>	<i>T. rubrum</i>
	<i>M. vanbreusegheimii</i>	<i>T. schoenleinii</i>
		<i>T. violaceum</i>
	<i>T. ajelloi</i>	

Figura 6.1 Análisis de piel vistas al microscopio que ayudan a la Identificación de dermatofitos



Fuente: Tomada del manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario de Cesar A. Gallo Lamping

Referencias

Gallo, Cesar. 2014. Manual de diagnostico con énfasis en laboratorio clínico veterinario. Universidad Nacional Agraria.

Harvey, J.W. 2001 Atlas of Veterinary Hematology, Blood and Bone Marrow of Domestic.

Ihrke, PJ. 2010. Procedimientos Diagnósticos en Dermatología Veterinaria (en línea). California,UUEE. Universidad de California. Disponible en :http://www.amvepa.org.py/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=45&Itemid=92.

Koneman Elmer W. Diagnóstico Microbiológico texto y Atlas. Edit. Panamericana.

Lamping Larios, M; García, T. 1996. Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos, Manual para Estudiantes de Ciencias Agropecuarias en Educación Superior. Nicaragua. UNA. 241 p.

Madigan, M. T., Martinko, J.M., Parker, J. 2001. Brock Biología de los microorganismos. Octava edición, Editorial. Prentice Hall, Madrid, España.

Manrique, S. 1981. Microbiología general. UNAM. México, D.F

Messeguer, JP. 1999. Manual de Propedéutica y Biopatología Clínica. 2 ed. Zaragoza, España.

Messeguer, JP; Gómez Piquer, J; Verde Arribas, MT; Marca Andrés, C; Gascón Pérez, FM; Garcia-Belenguer Laita, S; Aceña Fabián, MC. 1992. Manual Práctico de Análisis Clínicos en Veterinaria. Zaragoza, España. MIRA. 445 p.

Meyer, DJ; Harvey. JW. 2007. Medicina Laboratorial Veterinaria, Interpretación y Diagnosis. 3 ed. Barcelona, España. Multimedica. 452 p.

Presscott, L.M., Harley, J. Klein, D.A. 2000. Microbiología. Cuarta edición, Editorial McGRAW-HILL Interamericana, Madrid, España.

Para saber más:**Consultar las páginas**

<http://imb.usual.es/Práctica2/Práctica2.pdf>

<http://argos.portalveterinaria.com/noticia/7591/articulos-archivo/alteraciones-cuantitativas-de-la-serie-blanca.html>

<http://www.sevc2015.com/index.php/es/programa-cientifico/medicina-interna/304-anemias-no-regenerativas-protocolo-de-diagnostico>

<https://ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/11307064v21n3/11307064v21n3p232.pdf>

<https://labclinveterinario.files.wordpress.com/2009/03/urianalisis-en-perros1.pdf>

<http://argos.portalveterinaria.com/noticia/6745/articulos-archivo/claves-en-la-interpretacion-de-los-resultados-obtenidos-mediante-la-tira-reactiva-de-orina-en-perros-y-gatos.html>

<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/7225/articulos-otros-temas/utilidad-clinica-del-examen-general-de-la-orina-en-la-interpretacion-de-las-enfermedades-del-sistema-renal-y-urinario-de-los-animales.html>

Apéndice A. Consejo Editor Universidad Autónoma de Nayarit

PEÑA- GONZÁLEZ, Jorge Ignacio. MsC.
Rector

Vocales

NAVARRETE-MÉNDEZ, Adrián. MsC.
Secretario General

CAYEROS- LÓPEZ, Laura Isabel. PhD.
Secretario de Investigación y Posgrado

GALVÁN- MEZA, Norma Liliana, PhD.
Secretario de Docencia

NUÑEZ -RODRÍGUEZ, Gabriel Eduardo. MsC.
Secretario de Servicios Académicos

MEZA-VÉLEZ, Daniella. MsD.
Secretario de Educación Media Superior

RIVERA-GARCÍA, Julio. MsF.
Secretario de Vinculación y Extensión

GÓMEZ-CÁRDENAS, Juan Francisco. MsI.
Secretaría de Finanzas y Administración

Apéndice B. Consejo Editor ECORFAN

BERENJEII, Bidisha. PhD.
Amity University, India

PERALTA-FERRIZ, Cecilia. PhD.
Washington University, E.U.A

YAN-TSAI, Jeng. PhD.
Tamkang University, Taiwan

MIRANDA-TORRADO, Fernando. PhD.
Universidad de Santiago de Compostela, España

PALACIO, Juan. PhD.
University of St. Gallen, Suiza

DAVID-FELDMAN, German. PhD.
Johann Wolfgang Goethe Universität, Alemania

GUZMÁN-SALA, Andrés. PhD.
Université de Perpignan, Francia

VARGAS-HERNÁNDEZ, José. PhD.
Keele University, Inglaterra

AZIZ, POSWAL, Bilal. PhD.
University of the Punjab, Pakistan

HIRA, Anil, PhD.
Simon Fraser University, Canada

VILLASANTE, Sebastian. PhD.
Royal Swedish Academy of Sciences, Suecia

NAVARRO-FRÓMETA, Enrique. PhD.
Instituto Azerbaidzhan de Petróleo y Química Azizbekov, Rusia

BELTRÁN-MORALES, Luis Felipe. PhD.
Universidad de Concepción, Chile

ARAUJO-BURGOS, Tania. PhD.
Universita Degli Studi Di Napoli Federico II, Italia

PIRES-FERREIRA-MARÃO, José. PhD.
Federal University of Maranhão, Bra

RAÚL-CHAPARRO, Germán. PhD.
Universidad Central, Colombia

GANDICA-DE-ROA, Elizabeth. PhD.
Universidad Católica del Uruguay, Montevideo

QUINTANILLA-CÓNDOR, Cerapio. PhD.
Universidad Nacional de Huancavelica, Peru

GARCÍA-ESPINOSA, Cecilia. PhD.
Universidad Península de Santa Elena, Ecuador

ALVAREZ-ECHEVERRÍA, Francisco. PhD.
University José Matías Delgado, El Salvador.

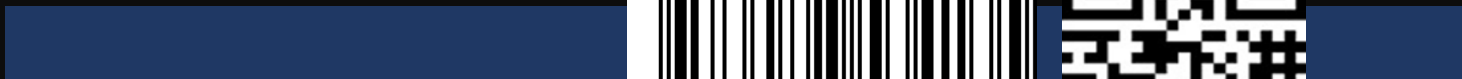
GUZMÁN-HURTADO, Juan. PhD.
Universidad Real y Pontifica de San Francisco Xavier, Bolivia

TUTOR-SÁNCHEZ, Joaquín. PhD.
Universidad de la Habana, Cuba.

NUÑEZ-SELLES, Alberto. PhD.
Universidad Evangelica Nacional, Republica Dominicana

ESCOBEDO-BONILLA, Cesar Marcial. PhD.
Universidad de Gante, Belgica

ARMADO-MATUTE, Arnaldo José. PhD.
Universidad de Carabobo, Venezuela



9 786078 534135
ISBN: 978-607-8534-13-5



www.ecorfan.org