

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL LABORATORIO CLINICO
VETERINARIO EN EL CENTRO DE RECEPCION Y REHABILITACION
DE FAUNA SILVESTRE DEL DAMA**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	2
1. HEMATOLOGIA	2
2. QUÍMICA SANGUÍNEA	18
3. PARASITOLOGÍA GASTROINTESTINAL	19
4. ECTOPARÁSITOS	22
5. MICROBIOLOGÍA	24
6. CULTIVOS	25
7. UROANÁLISIS	28
BIBLIOGRAFÍA	30

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL LABORATORIO CLINICO VETERINARIO EN EL CENTRO DE RECEPCION Y REHABILITACION DE FAUNA SILVESTRE DEL DAMA

Autores: Acero E.J., Ramírez C., Cuadros L.M., Bernal J., Molano F., Sánchez A. Mahecha Y.

INTRODUCCIÓN

En el manejo de fauna silvestre áreas como microbiología, hematología, parasitología y química clínica, enmarcadas administrativamente en lo que se llama "pruebas de laboratorio" se convierten en herramientas básicas para la difícil tarea de establecer el diagnóstico etiológico en procesos patológicos. Por ello, la Asociación Macarena ha desarrollado este protocolo de Laboratorio Clínico Veterinario como fuente de ayudas diagnósticas en el centro de recepción y rehabilitación de fauna silvestre (CRRFS). Una de las finalidades de éste protocolo en el CRRFS es ayudar a el pronto diagnóstico, medicación y tratamiento de los animales allí alojados.

1. HEMATOLOGIA

Los síntomas, como expresión de una anomalía funcional en un animal enfermo, son de difícil percepción en fauna silvestre. Sin embargo el análisis de sangre por cuadro hemático constituye una manifestación fidedigna sintomática de un proceso morboso en el organismo. Por lo tanto el cuadro hemático se convierte en una herramienta de enorme valor práctico por su fácil acceso en todos los casos donde se sospeche de una enfermedad. Debe tenerse en cuenta que el porcentaje de los casos en que el examen de la sangre consigue establecer directamente el diagnóstico es muy bajo (excepto las hemoparasitosis) y que su importancia solo se detecta cuando se diagnostica como síntoma (Fowler, 1986).

El tejido conectivo sanguíneo, como objeto de estudio en el CRRFS se obtiene, sin excepciones, de sangre PERIFÉRICA por punción con aguja estéril calibre 27G y 25G en todas las aves, reptiles y mamíferos pequeños y/o neonatos de no más de 500 gramos; en mamíferos y reptiles de mayor tamaño opcionalmente se usan agujas calibre 24 G y

21 G siempre evitando al máximo la restricción química (Uhart y Demm, 2000).

La anatomía de los diferentes animales alojados en el CRRFS ha llevado a usar vasos sanguíneos de primera y segunda elección para la toma de la muestra coincidiendo con Fowler (1986) así:

En MAMIFEROS la primera elección es la vena femoral y la segunda la vena braquial con sus variaciones propias (Fowler, 1986).

En AVES se ha dividido según la longitud del hueso metatarsiano que expone la vena metatarsal medial, como proceden Hill y Burdick (1996). En aves con metatarso largo como Falconiformes y Passeriformes la primera elección es la vena metatarsal (Figura 1) y la segunda la vena braquial; en aves con metatarso corto como los Psittacidos la primera elección es la vena braquial. En aves muy pequeñas de menos de 80 gramos la primera elección es la vena yugular y como segunda elección la vena braquial (Hill y Burdick, 1996).



Figura 1. Muestra sanguínea tomada de la vena metatarsal.

En REPTILES, básicamente la experiencia en el CRRFS se ha obtenido en Quelonios. Para los de gran tamaño, se obtiene sangre de la vena yugular y en los de menor tamaño por punción en el seno venoso occipital tal como reportan Hill y Burdick (1996).

En todos los casos se tiene en cuenta la cantidad y la frecuencia con la que se extrae sangre para proteger la volemia del paciente (Uhart y Demm, 2000).

1.1 HEMATOCRITO O VOLUMEN DE GLÓBULOS ROJOS EMPACADOS (PCV):

En el CRRFS se utiliza para su determinación el método de la microescala (OPS, 1982), el cual se realiza con tubos capilares para maximizar la muestra y a su vez mantener la volemia del paciente (Uhart y Demm, 2000). El resultado se expresa como porcentaje.

Rutina Hematocrito por Microescala

Se puede utilizar cualquier tubo capilar pero se prefieren tubos heparinizados ya que en la centrifugación se obtiene un valor cualitativo con la línea blanca o leucocitaria en el borde sobrenadante de color rojo (OPS, 1982). Se procede colocando un tubo capilar sobre la sangre por el extremo heparinado (Figura 2), círculo rojo o en los sin anticoagulante por cualquier extremo y se procede como sigue:

- 1) Por capilaridad se deja ascender hasta las $\frac{3}{4}$ partes del capilar,
- 2) El extremo contrario se tapona con plastilina, arcilla o se sella con calor,
- 3) Se ubica el capilar en el cabezote con tubos de ensayo adaptados y se centrifuga a $12000 \text{ rev. min}^{-1} \times 6 \text{ min}$,
- 4) Se lee en el dispositivo de lectura para Microhematocrito con proyección de línea,

Como resultado se obtienen los siguientes tres valores que tienen gran importancia clínica:

- Del plasma: Índice Ictérico o Lipémico.
- De los Glóbulos Blancos: Cantidad cualitativa.
- De los Glóbulos Rojos: Porcentaje, el cual se obtiene como la proporción de células con relación al plasma; si está aumentado indica policitemia, no distinguible a simple vista si es Relativa o Verdadera y si está disminuida se relaciona con anemia (Mussman y Rave, 1978; Davidson y Henry, 1978; OPS, 1982; Schlam, 1985; Hill y Burdick, 1996).

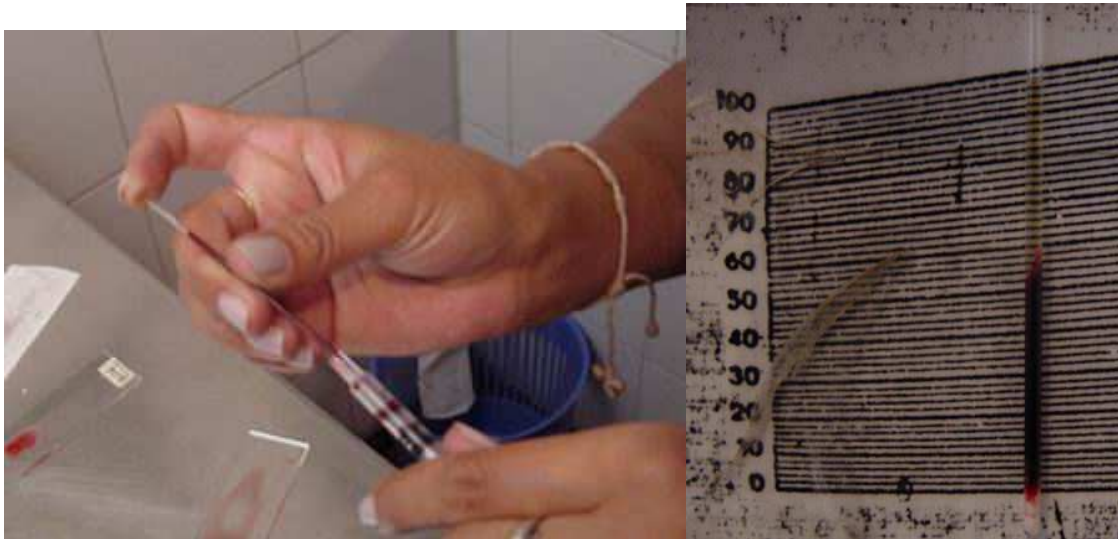


Figura 2. Toma de muestra para rutina de hematocrito. A la derecha se observa el tubo de hematocrito contrastado con la microescala

1.2 HEMOGLOBINA:

La prueba se hace por la técnica convencional, bien descrita en la literatura, la cual consiste en diluir 10 microlitros de sangre en 5 ml de Solución de Drabkin, para posterior lectura en espectrofotómetro a 540 nm de longitud de onda (OPS, 1982). El resultado se expresa en gr/dl y únicamente su disminución tiene importancia clínica al ser indicador de anemia cuando aparece junto con otras variables. Cabe anotar que el valor puede estar aumentado, pero esto es debido a una hemoconcentración por deshidratación o policitemia y no por un real incremento de la hemoglobina en la sangre (Davidson y Henry, 1978).

1.3 RECUENTO CELULAR DE ERITROCITOS EN HEMOCITÓMETRO DE NEUBAUER CON PIPETAS AFORADAS CUENTAGLÓBULOS:

El **RBC** o Recuento Total de Eritrocitos nos indica cuántos eritrocitos hay en un milímetro cúbico de sangre. Su valor, al igual que el del hematocrito, puede estar aumentado, indicándonos concretamente policitemia verdadera, o disminuido lo cual se relaciona con anemia (Mussman y Rave, 1978).

En **Mamíferos** requiere solución de formaldehído-citrato preparada así: a 99 ml de agua destilada se le adiciona 1 ml de Formaldehído al 37 % (formalina comercial). A esta solución se le adicionan 3.0 gr. de Citrato Sódico (se puede reemplazar por Oxalato de Amonio) (OPS, 1982). En

Aves y Reptiles el método seleccionado por rapidez consiste en utilizar una dilución con solución salina fisiológica.

Rutina Conteo de Eritrocitos o RBC: En Mamíferos, Aves y Reptiles con la pipeta de conteo para eritrocitos se toma solución de formaldehido-citrato o solución salina fisiológica hasta el aforado 101, se libera en un vidrio de reloj hasta el aforado 5 y lo demás se desecha. Se toma sangre hasta el aforado 5 con la misma pipeta y se mezcla con el líquido que se liberó en el vidrio de reloj. Se enjuaga la pipeta succionando y expulsando 3 veces. Se monta el hemocitómetro con la laminilla. Se esperan 5 min. y se cuentan las células presentes en cada cuadro (Davidson y Henry, 1978).

RBC= # de células x 10000

En caso de no existir una pipeta cuentaglóbulos, con pipeta corriente se realizan conteos de la siguiente forma: Con pipeta se toman 4 ml de Solución de Formaldehido-Citrato o Sol. Fisiológica y se liberan en un vidrio de reloj; se adicionan 0.02 ml de sangre y se mezclan con el líquido que está en el vidrio de reloj. Se enjuaga la pipeta succionando y expulsando 3 veces. Se monta el hemocitómetro con la laminilla. Se esperan 5 min., se lee y calcula como se expuso anteriormente.

1.3 INDICES ERITROCITICOS:

Volumen Corpuscular Medio o VCM: Indica el tamaño promedio de los glóbulos rojos, es muy importante porque nos dice en términos de tamaño celular si las células eritrocíticas son microcíticas, normocíticas o normales o macrocíticas, los cuales son conceptos que clasifican las anemias como regenerativas o no regenerativas (DAVIDSON y HENRY, 1978; MUSSMAN y RAVE, 1978).

El cálculo se hace de la siguiente forma:

VCM = Hematocrito*10/Total glóbulos rojos
Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular o CMHC:

Indica la cantidad promedio de hemoglobina que tienen 100 ml sangre; es importante porque indica la intensidad de la coloración de los eritrocitos (Hipocrómica o poco coloreado y Normocrómica o normalmente coloreado), los cuales son conceptos que junto a VCM

clasifican anemias (DAVIDSON y HENRY, 1978; MUSSMAN y RAVE, 1978)

CMHC = Hemoglobina*100/Hematocrito

1.4 FROTIS SANGUÍNEO:

El cuadro hemático en el CRRFS se determina con frotis sanguíneos convencionales, con las técnicas de rutina que para laboratorio de patología clínica describen Mussman y Rave (1978), Davidson y Henry (1978), OPS (1982), Schlam (1985) y Hill y Burdick (1996). Una vez hecho el frotis sanguíneo, usualmente se colorea con cualquiera de las dos tinciones, según lo sugerido por Fowler (1986), Wallace (1982), Alman y Cols (1997), Hill y Burdick (1996) y Uhart y Demm (2000) usadas para distinguir la celularidad y mantener las placas en montaje permanente, estas técnicas son:

Tinción de GIEMSA

Reactivos Necesarios y Preparación:

Una solución stock se prepara mezclando 0,75 gr de Colorante Giemsa en polvo con 65 ml. de Metanol al 97 %, completando luego a 100 ml. con Glicerol (aprox. 36 ml.). Se agita 3 veces al día por espacio de una hora a lo largo de cuatro días consecutivos, posteriormente se filtra y está la solución (OPS, 1983).

La Tinción de trabajo se prepara adicionando dos a tres gotas de la solución madre de Giemsa por cada ml. de Agua amortiguada*; para preparar mayores cantidades calculando para 100 ml de solución de trabajo se adicionan. 3,5- 5 o 10 ml. de solución madre. Esta mezcla no se debe agitar con excesivo brío por que se corre el riesgo de que el colorante se precipite (OPS, 1983).

*Solución Buffer de Fosfatos (Agua Amortiguada): Se mezclan 3,76 gr. de Fosfato Acido de Sodio Na_2HPO_4 y 2,1 g. de Fosfato diacido de Potasio KH_2PO_4 en 1000 ml de Agua destilada. Ajustar pH entre 7.0 y 7.2. Guardar en frasco ámbar (OPS, 1983).

Rutina de Coloración Giemsa

1) Hacer frotis,

- 2) Secar el frotis al ambiente,
- 3) Fijar en Metanol al 97 % por 3-5 min.
- 4) Secar al ambiente nuevamente,
- 5) Adicionar colorante de Giemsa al frotis por 30 min.
- 6) Escurrir la lamina,
- 7) Lavar la lamina con agua amortiguada de Fosfatos a chorro (DAVIDSON Y HENRY 1978; OPS 1982; SCHLAM 1985; UHART y DEMM, 2000).
- 8) Opcionalmente en el CRRFS montamos un cubreobjetos con resina Entellan o Bálsamo de Canadá.

Tinción WRIGHT :

La Tinción de trabajo se elabora adicionando a 300 ml de Alcohol METÁLICO al 96% 0.5 g de Colorante WRIGHT y posteriormente se adicionan 30 ml de Glicerina Pura (OPS, 1983).

Rutina de Coloración WRIGHT*

- 1) Hacer Frotis
- 2) Secar el frotis al ambiente
- 3) Adicionar el colorante por 3-5 min.
- 4) Adicionar agua destilada tamponada en Volumen igual
- 5) Esperar hasta aparición de espejo metálico 5 min.
- 6) Lavar la lamina con agua amortiguada de Fosfatos a chorro(DAVIDSON Y HENRY 1978; OPS 1982; SCHLAM, 1985)*.

* Opcional Montar en Entellan o Bálsamo de Canadá. En el CRRFS preferimos de manera regular esta coloración por agilidad en el proceso.

1.6 MORFOLOGÍA ERITROCITARIA:

Al ver la lámina coloreada al microscopio de manera normal, los eritrocitos en **Mamíferos** son células abundantes que se deben distinguir de las demás por su uniformidad en formas redondas y pequeñas (en promedio 7 micras) y anucleadas con color Eosinófilo (BANKS, 1981); en **Aves y Reptiles** los eritrocitos son de gran tamaño, biconvexos uniformes y con núcleo central alargado como la célula misma.; son más aguzados en aves (GRIFOLS,, 1996) que en reptiles (Martínez, 1996). Los citoplasmas de aves y reptiles son levemente Eosinófilos con núcleo basófilo (FOWLER, 1986).

Una vez coloreada la lámina existen detalles relevantes dentro de las características histológicas de los glóbulos rojos tienen significado clínico (MUSSMAN Y RAVE, 1978), estos detalles son:

- Fragmentos Nucleares (Células inmaduras o Rubricitos)
- Tipos de Cromasia (Hipocrómicos, Células Inmaduras o Reticulocitos)
- Poiquilocitosis (Δ Forma) como Equidnocito, Leptocito, Acantocito o Codocito
- Punteados Basófilos: Procesos Tóxicos (SCHILLING, 1977; DAVIDSON y HENRY, 1978; MUSSMAN, y RAVE, 1978; SCHALM, 1985) (ALMAN et al, 1997)

1.7 CONTEO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS:

Con la técnica de Coloración no solo se tiñen las células eritrocíticas, también lo hacen las células Leucocíticas por lo cual se puede contar y establecer diferencialmente cuales son las abundancias relativas o porcentuales de cada una de ellas; este conteo diferencial se realiza de manera convencional, como lo indican los procedimientos de laboratorio de patología clínica bien reseñados en Mussman y Rave (1978), Davidson y Henry (1978), (OPS (1982), Schlam (1985) y Hill y Burdick, (1996). En los diferentes grupos de fauna silvestre que se pueden hallar variaciones de tamaño que pueden llegar a ser propias de un Género taxonómico. Sin embargo existe un patrón para reconocer la forma de las células sanguíneas (HAWKEY Y BENNET, 1996).

Se debe tener en cuenta que en sangre se hallan dos líneas celulares y que solo los leucocitos componen los elementos figurados que sirven para hacer el conteo diferencial; los eritrocitos que se hallan no se cuentan aunque adicionalmente generan información valiosa (ver 1.6).

1.7.1. RECONOCIMIENTO DE LOS LEUCOCITOS PARA EL CONTEO DIFERENCIAL:

Los leucocitos tienen características histológicas en núcleo y citoplasma que son únicas y solo son reveladas con la técnica de tinción expuesta; son importantes para establecer un conteo diferencial y para derivar de él un buen diagnóstico paraclínico.

En mamíferos los patrones en general son:

- Neutrófilos: Células de 9 a 11 micras, con núcleo segmentado en 3 a 5 partes y con citoplasma transparente y abundante
- Basófilos: Como Neutrófilos pero el citoplasma aparece con gránulos redondos de color basófilo
- Eosinófilos: Como Neutrófilos pero su citoplasma aparece con gránulos redondos de color eosinófilo
- Monocito: Células grandes de 11 a 14 micras con citoplasma transparente y núcleo arriñonado o con forma de frijol
- Linfocitos: Células de tamaño muy variable de 7 a 13 micras con citoplasma transparente, núcleo basófilo abundante que ocupa la mayoría del espacio citoplasmático
- Plaquetas: Son restos celulares de color basófilo de aspecto fusiforme y tamaño de 1 a 3 micras
- Bandas: Son células inmaduras de la línea celular neutrófila y se reconocen por su forma nuclear en forma de media luna
- Células Plasmáticas: Tienen citoplasma transparente alargado y núcleo excéntrico de color basófilo (BANKS, 1981)

En aves y Reptiles:

Leucocitos:

- Los Neutrófilos son llamados Heterófilos: Células de 7 a 11 micras, con núcleo segmentado en 2 a 3 partes en aves (ALMAN, 1997), pero único de forma redonda y excéntrico en reptiles (FOWLER, 1986). En los dos casos el citoplasma se aprecia con gránulos abundantes de forma alargada y color eosinófilo (FOWLER, 1986).
- Basófilos: Como en Mamíferos, son células con gránulos redondos que se tiñen de basófilo (HAWKEY y BENNET, 1986).
- Eosinófilos: Como los de Mamíferos, son células con gránulos redondos de color eosinófilo (HAWKEY y BENNET, 1986).

- Monocitos: Células grandes de 9 a 14 micras con citoplasma transparente y núcleo arriñonado o en forma de frijol (HAWKEY y BENNET, 1986).
- Linfocitos: Células de tamaño muy variable de 5 a 13 micras con citoplasma transparente, núcleo basófilo abundante que ocupa la mayoría del espacio citoplasmático (HAWKEY y BENNET, 1986).
- Trombocitos: Análogo de las plaquetas, son células verdaderas de tamaño homogéneo de 5 micras con núcleo muy basófilo (Cromatina muy condensada) (HAWKEY y BENNET, 1986).
- Células Plasmáticas: Iguales a las halladas en Mamíferos con núcleo basófilo y excéntrico y citoplasma transparente (HAWKEY y BENNET, 1986).
- Azudofilos: Similares a las basófilas, solo están presentes en reptiles y se reconocen por su coloración basófila total con un núcleo (HAWKEY y BENNET, 1986).

Se debe tener en cuenta que cada una de estas células leucocíticas descritas para Mamíferos, Aves y Reptiles tienen unas proporciones que están bien referenciadas para algunas especies en la bibliografía mientras que para otras no hay referencia. Por lo tanto es necesario contextualizar para cada especie y relacionarlo con el sistema inmunológico para así determinar en cada caso si están o no actuando en un proceso patológico en curso; aclarando que este protocolo escapa a esos objetivos, que si están bien pueden estar citados en textos específicos para ciertos grupos de animales como Mamíferos (WALLACE 1982; FOWLER, 1986), Aves (ALMAN et. al., 1997; GRIFOLS, 1996; WALLACE 1982; FOWLER, 1986) y Reptiles (MARTINEZ, 1996; WALLACE 1982; FOWLER, 1986) no siempre son la regla general, como por ejemplo:

En Neutrofilos se puede descubrir la cronicidad o agudeza de un patología :

- Desviaciones a la Izquierda (Bandas) -Procesos Agudos
- Desviaciones a la Derecha (Hipersegmentación) - Procesos Crónicos

En monocitos, la inmunoreactividad

- Aumento - Reactividad inmunológica, buena respuesta inmune

- Disminución - Débil reactividad inmunológica, mala respuesta inmune

En Basófilos (vasomodulación) inflamación

- Aumento - Proceso inflamatorio en curso
- Disminución - Normal

En Eosinófilos, inflamación, alergia, parasitosis

- Aumento - Proceso inflamatorio en resolución, alergia o parasitosis
- Disminución - Normal

En Linfocitos, producción de anticuerpos

- Aumento con o sin Células Plasmáticas - Producción activa de anticuerpos, proceso crónico y/o viral
- Disminución - Débil respuesta humoral/ predominio respuesta celular (FOWLER, 1986; WALLACE, 1982; GRIFOLS, 1996; UHART Y DEEM, 2000; HILL Y BURDICK, 1996).

1.8 RECUENTO TOTAL DE LEUCOCITOS O WBC:

Nos indica cuantos leucocitos hay en un mm cubico de sangre. Su valor puede estar aumentado indicándonos concretamente leucocitosis o disminuido lo cual indica leucopenia (MUSSMAN y RAVE, 1978) (UHART y DEMM, 2000). Conociendo el conteo diferencial o porcentual de leucocitos (ver 1.7) y el WBC podemos calcular el valor verdadero de cada uno de los leucocitos, es decir cuantos hay de cada uno de ellos por mm cubico lo cual nos genera una mejor aproximación hacia un proceso patológico si existe (DAVIDSON y HENRY, 1978).

Conteo WBC con pipeta aforada Cuentaglobulos de Neubauer: En **mamíferos** se hace con una solución de Tuerk previamente preparada, la cual se elabora en dos fases:

- 1- Se disuelven 0,3 gr. de Azul de Metileno en 100 ml de Agua destilada.
- 2- En otro recipiente a 200 ml de Agua destilada se la adicionan 4 ml. de Acido
- 3- Acético Glacial y finalmente a esta Solución se la adicionan 10 gotas de la mezcla (OPS, 1982)

Conteo Leucocitos : Con la Pipeta de conteo para leucocitos se toma Solución de Tuerk hasta el aforado 11, se libera en un vidrio de reloj hasta el aforado 5 y lo demás se desecha ; se toma sangre hasta el aforado 5 con la misma pipeta y se mezcla con el liquido que esta en el vidrio de reloj. Se enjuaga la pipeta succionando y expulsando 3 veces. Se monta el hemocitómetro de Neubauer con la laminilla. Se esperan 5 min. y se lee *.

Cálculo = # de Células x 2000. (OPS, 1982)

**Se suma el número de células contadas y se divide por el número de cuadros contados*

El Recuento celular de leucocitos en hemocitómetro de Neubauer con pipeta corriente. Si en el Laboratorio no hay pipeta cuentaglobulos, se procede de así:

Con pipeta se toman 0.95 ml de Solución de Tuerk, se liberan en un vidrio de reloj; se adicionan luego 0.05 ml de sangre y se mezclan con el liquido que esta en el vidrio de reloj. Se enjuaga la pipeta succionando y expulsando 3 veces. Se monta el hemocitómetro de Neubauer con la laminilla. Se esperan 5 min. y se lee.

En aves y reptiles el WBC - se hace con el método de estimado indirecto **After L. . McEntee** obteniendo un frotis coloreado de buena calidad (una sola capa de células) teñido con Wright o Giemsa, como esta reseñado en el texto arriba. Se procede contando en 10 campos con objetivo de 40 X, el numero de leucocitos totales se divide en el numero de campos contados. El promedio obtenido se multiplica por 2000 y el resultado es el WBC. Si el Hematocrito esta aumentado por debajo o por encima de lo normal se genera un factor de corrección para WBC dividiendo el Hematocrito observado por el normal teórico. Así WBC se multiplica por el valor de corrección y WBC corresponde al valor

real (ALMAN, et al, 1997) (HILL y BURDICK, 1996) (UHART y DEMM, 2000)

1.9 Tiempo de Coagulación:

La sangre tiene factores de coagulación que se activan extrínsecamente una vez están por fuera del conducto vascular. El método de WRIGHT se realiza con capilares no heparinizados a los cuales se les hace ingresar sangre de una sangría, después de 4 min. el capilar se parte, observando que las fracturas se mantienen unidas entre las partes por un hilo de fibrina, el tiempo de coagulación es el transcurrido entre la toma de la muestra y el hilo de fibrina (OPS 1982).

2. PROCEDIMIENTOS ESPECIALES

2.1 HEMOPARÁSITOS

Cuando se generan láminas coloreadas se hace una revisión preliminar antes de hacer el cuadro hemático, ya que eventualmente pueden existir en sangre fuera de las células o al interior de ellas elementos extrínsecos como hemoparásitos:

- Presencia de Hemoparásitos :

Extracelulares; Trypanosoma spp. , Filaria spp. y Leucocytozoon spp

En Monocitos; Leishmania spp. y Leucocytozoon spp.

En Eritrocitos; Hemobartonella, Plasmodium, Haemoproteus, Babesia y Anaplasma spp (SOULSBY, 1982).

Trypanosomas y Filarias: Estos parásitos se pueden descubrir en sangre en preparaciones de conteo diferencial (Figura 3), pero también por coloración de gota gruesa (OPS, 1982). Existe sin embargo un método de concentración por centrifugaciones repetidas cuando se sospecha de la enfermedad pero los métodos anteriores no lo demuestran.

Se hace punción venosa y se dispone en tubo cónico de 9 partes. A este se le adiciona una parte de Citrato de Sodio al 3.8 %. Se mezcla y se centrifuga tres minutos a velocidad media. Se extrae el sobrenadante

(plasma) y la línea celular blanca se deposita en tubo marcado con el número dos y se centrifuga a velocidad media por cinco minutos. Se extrae el líquido sobrenadante el cual se deposita en un tubo marcado con el número tres, se vuelve a centrifugar pero a velocidad alta por diez minutos. Se examinan los sedimentos del tubo dos para detección de Filarias y del tubo tres para detección de Trypanosomas (OPS, 1982).

Filariasis: Cuando en biopsia de piel se sospecha la existencia de microfilaria se procede como sigue: La muestra de la biopsia con un tamaño de entre 2 a 3 mm se dispone sin cubreobjetos en una lamina previamente impregnada con una gota de solución fisiológica de Cloruro de Sodio, posteriormente se pone un cubreobjetos rellenando el área faltante con mas solución fisiológica y se esperan 10 minutos. Con escasa abertura del condensador en objetivo 10 X se observa al microscopio detectando las microfilarias tratando de salir al liquido. Si hay microfilarias se tiñen como en frotis con Giemsa (OPS, 1982; UHART y DEMM, 2000).

Leishmaniasis: En Leishmaniasis visceral se procede preparando previamente 100 ml de agua destilada con 2 ml de Acido Acético Glacial. Se toman luego 9 partes de esta solución y se le adiciona 1 parte de sangre venosa. Se mezclan por tres minutos y se realizan extensiones de sangre en porta objetos. Se fijan en Metanol y tiñen como en Giemsa. Si se observan en los macrófagos inclusiones citoplasmáticas de color rojo es positivo. Cuando se encuentran lesiones con Leishmaniasis cutánea los bordes indurados se raspan y la secreción de carácter seroso por irritación del borde de la pápula se pone en un porta objeto, se fija y se tiñe como en Giemsa (KONEMAN et al, 1987).

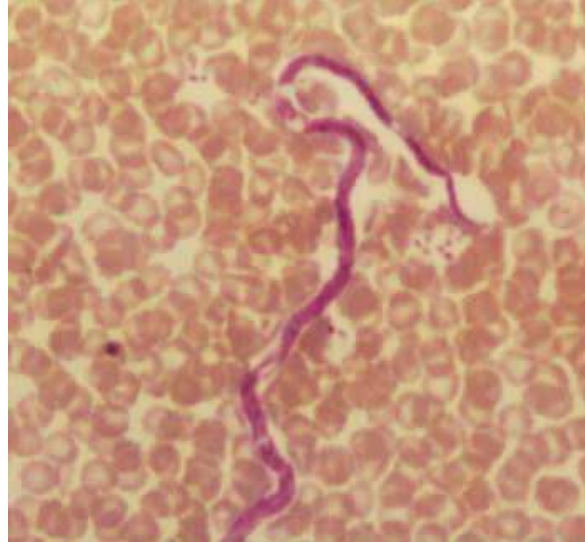


Figura 3. Microfilarias encontradas en un individuo de *Saguinus leucopus*

**Haemoproteus sp., Leucocytozoon sp., Plasmodium sp. ,
Haemobartonella sp., Erlichia, Anaplasma:**

Se detectan muy bien en sangre, se colorean convencionalmente con el método Wright o Giemsa. *Haemoproteus* sp. se observa como un gametocito alargado dentro de los glóbulos rojos con gránulos negros en forma de haltera, sin deformar la célula eritrocítica. *Plasmodium* sp. se observa dentro de las células eritrocíticas con forma redonda y pigmentos negros. *Leucocytozoon* sp. (Figura 4) se observa de forma alargada sin pigmentos y deformando el eritrocito o monocito (FOWLER, 1986; WALLACE, 1982; MEHLORM et al, 1993; ALMAN et al, 1997) *Haemobartonella* sp. se reconoce por dos o tres puntos basófilos en células. *Erlichia* sp se reconoce por la coloración eosinófila dentro de los eritrocitos y *Anaplasma* sp. por su carencia de coloración o birrefringencia en eritrocitos (MEHLORM et al, 1993).

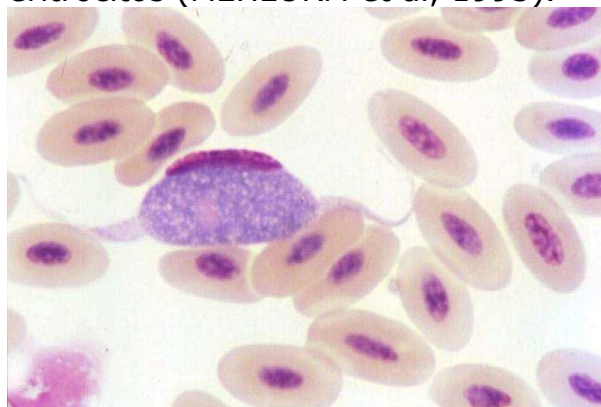


Figura 4. Leucocytozoon encontrado en un individuo de *Buteo platypterus*

2.2 CITOLOGÍA:

Muchas muestras biológicas obtenidas por biopsia o necropsia e inclusive las secreciones obtenidas post -punción nos pueden dan pistas por su naturaleza celular y sobre que evento fisiológico o patológico esta sucediendo. Para ello la Tinción rápida de H & E debido a sus capacidades tintoriales por gradientes de pH permite establecer con certeza la naturaleza de la muestra biológica (GAVIÑO et al, 1975). En este caso se procede así:

Tinción de Hematoxilina y Eosina:

- 1) Tinción general de Hematoxilina & Eosina
- 2) Poner la muestra sobre la lamina y si es necesario hacer squach
Adicionar Hematoxilina 12- 15 min.
- 3) Lavar con Agua
- 4) Adicionar Solución Acida 15 seg. máximo
- 5) Lavar con agua
Agregar Solución Básica hasta que el frotis muestre un color azul.
Aproximadamente, 15 seg.
- 8) Lavar con agua
Adicionar Eosina máximo 20 seg.
- 9) Lavar con agua
- 10) Observar: Las estructuras acidófilas (Núcleos Celulares) se tiñen de color azul; las estructuras Basófilas (Citoplasmas, Fibras y Formes) se tiñen de color rosado (GAVIÑO et al, 1975).

3. QUÍMICA SANGUÍNEA

Sustancias químicas endógenas o exógenas circulan en sangre en cantidades permanentes y son reguladas por ciclos bioquímicos; de hecho la alta o baja concentración de estas sustancias reflejan tasas de actividad metabólica altas o bajas e inclusive daño en un órgano o sistema (WIDMANN, 1981). Sin excepción el calculo de la cantidad de estas sustancias químicas se hace en suero o plasma por técnicas espectrofotométricas a través de KITS diagnósticos comerciales (MUSSMAN y RAVE, 1978; DAVIDSON y HENRY, 1978; BARREIRO, 1992). Usualmente, se requieren determinaciones precisas de

Transaminas, Aspartato Alanino Transaminas- AST, Alanino Transaminas ALT, Proteínas Totales, Nitrógeno Uréico Sanguíneo - BUN, Creatinina y eventualmente Glucosa.

Alanina transaminasa ALT/GPT y Aspartato transaminasa AST/GOT Se realizan con Kits Comerciales Marca SERAPAK de BAYER, cuyo método es el enzimático de Reitman y Frankel, con lectura a 365, 340 y 336 nm.

Creatinina se realiza con Kits Comerciales Marca SERAPAK de BAYER, cuyo método es Jaffe con desproteínización y lectura a 490 nm.

Glucosa se lee con Kits Comerciales Marca SERAPAK de BAYER®. La técnica enzimática colorimétrica GOD/PAP (Glucosa Oxidasa Peroxidasa) y se lee a 546 nm.

BUN se lee con Kits Comerciales de BOHERINGER MANNHEIM. La técnica es la enzimática colorimétrica uricasa y se lee a 450 nm.

Proteínas Totales se lee con TECNICA CONVENCIONAL colorimétrica DE BIURET.

El espectrofotómetro usado para hacer las lecturas es un Zeiss XL25 Digital sobre un volumen final de muestra de 0,5 ml

4. PARASITOLOGÍA GASTROINTESTINAL

La determinación de parásitos tiene el fin biológico de identificar taxonómicamente hasta donde sea posible el organismo y el interés veterinario de conocer información acerca del grado de infestación y establecer el plan sanitario correspondiente.

Se hace un muestreo directo en materia fecal, luego se realiza extendido en portaobjetos con una gota de agua en un extremo y al otro extremo una de lugol. Se observa con cubreobjetos en el menor aumento con diafragma cerrado en el microscopio (OPS, 1982) (VELEZ, 1995).

Método de Concentración para Protozoarios, Tremátodos Céstodos y Nemátodos:

Se usa esta técnica cuando se obtienen huevos que pueden ser fotografiados debido a la limpieza con la cual aparecen; Se conoce como MIF o Método de concentración de Formaldehído Eter y se usa

para huevos, larvas y especialmente para quistes de protozoos, aunque funciona bien en huevos de Nemátodos, Céstodos y Tremátodos. Se procede así:

- Se deshacen 2 g de excrementos en 10 ml de solución fisiológica de NaCl , luego se filtra con gasa, el líquido recolectado se centrifuga a 3000 rpm por 3 min., se desecha el sobrenadante y se vuelve a lavar con solución fisiológica; se vuelve a desechar el sobrenadante.
- Se añaden 10 ml de formaldehído al 10 %, se mezcla y se deja reposar por 5 min. se agregan luego 3 ml de Eter y se agita vigorosamente por 30 seg.
- Se centrifuga 1 min. a baja velocidad y se remueven todas las capas dejando el sedimento. Se monta y se observa (MEHLORM et al, 1993; VELEZ, 1995).

La Tinción se debe hacer con solución de **LUGOL** la que se logra mezclando 1g de Yodo con 2 g. de KI en 100 ml de agua destilada y guardar en frascos Ambar (OPS, 1982).

Otra de las técnicas para detección de Parásitos se basa en la Flotación en soluciones Densas y es la técnica que se usa por su fácil acceso y rápido diagnóstico.

- **La solución de Wills (NaCl)** Indicada para Ascaroideos y Estyrongilidos con densidad de 1.200 para el método de flotación se prepara adicionando a 500 ml. de agua destilada 125 g de NaCl. Enfriar y dejar reposar ; si después del reposo toda la sal esta disuelta se agregan 50 g. mas de NaCl hasta saturación (DUNN, 1983; MEHLORM et al, 1993; VELEZ, 1995).
- **La solución de Sheather (Azúcar)** con una gravedad de entre 1.117 y 1.300 se prepara adicionando 454 g de sucrosa y 6ml de formol al 10 % en 355 ml de agua (DUNN, 1983; BARREIRO,1992; VELEZ, 1995; UHART y DEMM, 2000).
- **Solución de Sulfato de Zinc** para tremátodos con una densidad de 1.180 (33 %) y sulfato de magnesio para estyrongílicos, metastrongilos y ascaroideos con una densidad de 1.280 (35 %). Se usa cuando existen huevos que no flotan fácilmente.

- **Solución de Nitrato de Sodio** con una densidad de 1.380 para spirocerca y tricuroideos (DUNN, 1983; MEHLORM et al, 1993; VELEZ, 1995).

Rutina para endoparásitos por el método de flotación

- 1) Tomar un gramo de materia fecal
- 2) Diluirla en 10 ml de solución fisiológica agitando vigorosamente filtrar en gasa y recoger filtrado
- 3) Centrifugar a 2800 rpm por 4 min. y desechar el sobrenadante
- 4) Adicionar al sedimento la solución saturada (sin llenar el tubo)
- 5) Agitar hasta que el sedimento desaparece
- 6) Completar el contenido con solución saturada hasta invertir el menisco
- 7) Colocar una laminilla sobre el menisco y esperar de 15 min. a 2 horas
- 8) Retirar la laminilla manteniendo el tubo en posición vertical
- 9) Teñir la lamina y los frotis directos con lugol (DUNN, 1983; BARREIRO, 1992; MEHLORM et al, 1993; VELEZ, 1995 ; UHART y DEMM, 2000).

Fijador para exámenes Endoparasitológicos

La solución de formol al 10 % se prepara mezclando 100 ml de agua con 10 ml de formol comercial (40%) , se usa para mantenimiento de céstodos (Figura 5), helmintos, huevos o larvas de protozoos quistes (DUNN, 1985; MEHLORM et al, 1993 ; VELEZ, 1995; UHART y DEMM, 2000).



Figura 5. Céstodos encontrados en una boa

5. ECTOPARÁSITOS

Piojos, Pulgas y Garrapatas: Se hacen observaciones directas de los ectoparásitos que han sido obtenidos por raspado, con una superficie plana u hoja de bisturí impregnada con glicerina pura o aceite mineral, se dispone en una lámina portaobjeto y con cubreobjeto se observa en objetivo 3.2 X con condensador levemente cerrado (VELEZ, 1995).

Acaros: De una lesión hacer raspado profundo hasta sangrar se obtiene la muestra que con aceite mineral se dispone sobre el cubre objetos, se añade una gota de NaOH al 5 %, se calienta (hasta digestión parcial) y se cubre con laminilla. Esperar 10 min. hasta que se aclare y observar. Si no se observan mezclar todo el raspado con 10 ml. de NaOH al 10 % y calentar al baño de María hasta ebullición (evitar ebullición prolongada). Enfriar y centrifugar a 2000 r.p.m. por 2 min. Observar el sedimento emulsionando con Glicerina (MEHLORM, et al, 1993;VELEZ, 1995; UHART y DEMM, 2000).

Hongos: Se procede con técnica similar a la anterior (digestión de queratina). Se obtiene una muestra de pelo (5-10), adicionar una gota de NaOH al 20 % y se cubre con un laminilla. Se pasa por una llama 30 segundos y se enfría. Se observa en microscopio en 40X con condensador disminuido alrededor del "fantasma" de los pelos. Los hongos y esporas unicelulares se observan en agrupaciones de formas redondas con membranas transparentes. Hongos filamentosos se

observan fuera o en el interior del pelo a lo largo con burbujas en el interior. Para descartar posibles errores se realiza un procedimiento paralelo con pelos provenientes de zonas sanas (KONEMAN et al, 1987).

6. MICROBIOLOGÍA

El estudio y conocimiento básico de la microbiología aporta en medicina veterinaria la etiología de las enfermedades infecciosas lo cual desencadena finalmente en la medicina preventiva, que es el corolario de la protección en salud pública.

La investigación microbiológica bacteriana se realiza con base en la tinción diferencial de Gram y la taxonomía bacteriana basada en la forma (cocos y bacilos). Estas son la base del diagnóstico clínico (KONEMAN et al, 1987). Para ello se usa la Tinción de Gram se utilizan las siguientes soluciones:

- Solución saturada de cristal violeta o violeta de genciana se prepara mezclando 4 g. de colorante en 20 ml de alcohol etílico al 95 %. Se le agrega 10 ml de oxalato amónico al 1 %.
- Solución yodada de Gram se logra mezclando 1g de yodo con 2 g. de KI en 300 ml de agua destilada y guardar en frascos Ambar
- Solución de alcohol-acetona se prepara mezclando 70 partes de alcohol etílico al 95 % por 30 partes de acetona.
- Solución acuosa de fucsina se logra mezclando 2 g. de colorante en 15 ml de alcohol etílico al 95 % (OPS, 1982)

Tinción de Gram:

- 1) Se toma frotis y se seca al ambiente con posterior adición de calor por 1 a 3 min evitando quemar.
- 2) Adicionar cristal violeta por 60 seg.
- 3) Lavar con agua destilada
- 4) Adicionar el mordiente de lugol por 1 min. Verter el exceso
- 5) Adicionar alcohol acetona y secar por 15 seg. max.
- 6) Lavar con agua
- 7) Adicionar el colorante de contraste fucsina por 60 seg.
- 8) Lavar con agua

9) Observar morfología y tinción de Gram: positivo color azul y negativo color Rojo

Otras tinciones diferenciales y los reactivos que las componen son:

Tinción de Shaefer- Fulton:

Para bacilos esporoformadores con verde de malaquita al 1% p/v en 100ml de agua

Rutina de Coloración:

El frotis se cubre en exceso con verde de malaquita y se calienta hasta emanación de vapores 3 o 4 veces por 30 seg. Se lava el exceso de colorante con agua destilada durante 30 seg. Se la adiciona fuscina de Gram y luego lavar. Observar bacilos esporulados con esporas de color verde y las partes vegetativas de color rojo (DAVIES et al, 1984; KONEMAN et al, 1987).

Tinción Ziehl Nielsen:

Para mycobacterium acido resistentes, requiere de:

- La solución de fuscina fenicada se prepara mezclando 1 gr. de fuscina básica con 10 ml de alcohol etílico al 95 % a los que se les adicionan 90 ml. de fenol o ácido fénico al 5 %.
- Solución alcohol ácido: Se prepara mezclando 2 ml. de HCL de alta graduación con 98 ml de alcohol etílico al 95 %
- Solución de azul de metileno al 5 %. Se mezclan 10 g. de azul de metileno en 100 ml. de agua destilada.

Rutina de Coloración:

Al frotis habitual se le adiciona la fuscina fenicada en exceso y luego se calienta hasta producción de vapores por espacio de 3 min. Se decolora con solución alcohol ácido y finalmente se colorea de nuevo con solución de azul de metileno. Lavar y observar. Acido resistentes positivos tiñen rojo y ácido resistente negativo azul (DAVIES et al, 1984; KONEMAN et al, 1987).

7. CULTIVOS

Es necesario en el laboratorio aislar colonias bacterianas con el fin de establecer de manera particular actividades bioquímicas de las bacterias que posteriormente permiten hacer una aproximación taxonómica hasta género (KONEMAN, et al, 1987). Las normas generales para realizar los medios de cultivo son:

- 1) El material de vidrio se esteriliza en calor seco y/o autoclave.
- 2) Se preparan los agares según las proporciones mencionadas por el fabricante en la cantidades requeridas.
- 3) Se calienta el agua en un erlenmeyer y se disuelve el agar.
- 4) Se esteriliza con calor húmedo o autoclave a 120 °C y 15 libras de presión por 20 min.
- 5) Se sirve en cajas de petri previamente esterilizadas
- 6) Se dejan 24 horas en sensibilidad a 37 °C (KONEMAN et al, 1987)

Cultivos para GRAM positivos

Agar Nutritivo: Es el mismo agar común; su relación es de 28 g / L. Este es un medio general base. Allí crecen todo tipo de hongos y bacterias. Es importante conocer la morfología de la colonia. Si es cremosa redonda probablemente son cocos; si es seca e irregular probablemente son bacilos. Sobre este agar se realiza el antibiograma respectivo a través de sensidiscos según el antibiótico (KONEMAN et al, 1987).

Agar Sangre: Se prepara inicialmente como el agar nutritivo hasta servirlo en cajas de petri y se calienta hasta llegar a 42 °C cuando se le adiciona sangre sin anticoagulante en relación de 100 ml. de agar en volumen (preparado) por cada 3 ml de sangre. Es un medio diferencial para establecer patrones de alfa-emolisis incompleta o beta-hemólisis completa en cepas patógenas . La hemólisis se lee como halo de transparencia alrededor de la colonia (KONEMAN et al, 1987; DAVIES et al, 1984)

Agar Salado Manitol: Su relación es de 108 g /L. Determina manitol + en cepas de *stafilococos* patógenas quienes son además halófitas. El medio preparado es de color rosado o rojizo. Las colonias manitol + se

observan con halo amarillo luminoso y las manitol - son colonias pequeñas y sin brillo (KONEMAN et al, 1987; DAVIES et al, 1984).

Caldo Tioglicolato: Es un medio líquido de color amarillo pardo preparado con una relación de 29 g / lt. Se envasa en tubos de 5 ml. de capacidad y sirve como medio de transporte. Se usa para cultivos anaeróbicos al sellarlo con parafina o aceite de ricino después del sembrado. Hay anaerobiosis si aparecen burbujas o si hay desplazamiento del tapón de parafina (KONEMAN et al, 1987 ; DAVIES et al, 1984).

Pruebas para Tipificación Bioquímica:

Para GRAM positivo

Prueba de la Catalasa: A una colonia aislada se le adiciona una gota de H_2O_2 . Si hay burbujeo es catalasa + y cuando es catalasa negativo no hay cambios. El peróxido de hidrogeno debe estar preparado al 3 %.

Prueba de la Coagulasa: A un frotis de una colonia aislada se le adiciona una gota de plasma sanguíneo con EDTA. Si aglutina el plasma es coagulasa + y lo contrario es coagulasa negativo (KONEMAN et al, 1987; DAVIES et al, 1984).

Para GRAM negativos

EMB: El medio usa una relación de 36 g /L. Es un medio selectivo indicado para enterobacterias en las cuales además se puede determinar su capacidad para fermentar lactosa, clasificándose como colonias lactosa + cuyo color es rojizo con brillo verde metálico y lactosa negativo para colonias cuya coloración es clara, ámbar o casi incolora. (KONEMAN et al, 1987; DAVIES et al, 1984).

Pruebas para tipificación bioquímica seriada:

Todas las pruebas bioquímicas aquí mencionadas se hacen con sistemas comerciales de identificación microbiana para enterobacterias, usando el Kit comercial API 20 (Figura 6) el cual consta de una serie de microtúbulos con 20 agares deshidratados que se reconstituyen al hacer la respectiva siembra por inoculación. Entre las pruebas que realiza el KIT sobresalen:

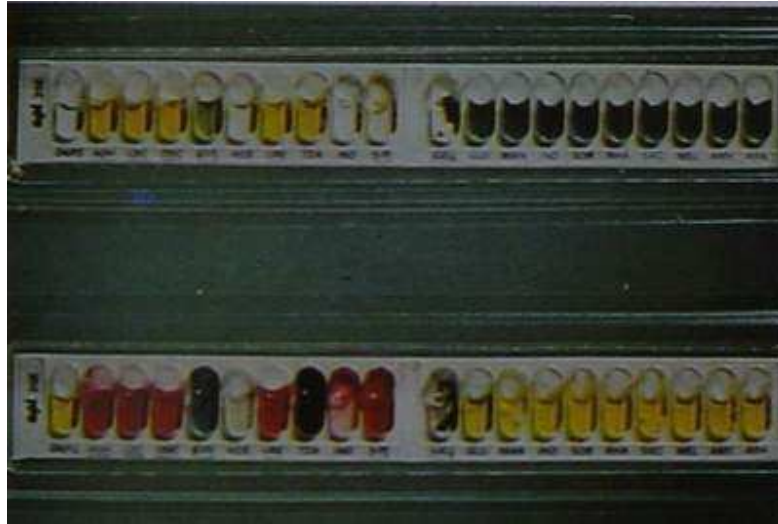


Figura 6. Kit comercial API 20

TSI= Triple azúcar hierro. Determina formación de H_2S por reducción del tiosulfato y degradación de azúcares por peso específico ordenados de arriba a abajo así: Lac, Sac, Gluc. La fermentación del azúcar específico se detecta por viraje del color del medio de rojo fenol originalmente a amarillo. También se puede establecer la formación de gas por desplazamiento del medio en el tubo de ensayo.

SIM= Sulfuro indol motilidad. El medio originalmente es de color amarillo. Determina la formación de H_2S por motilidad con migración perpendicular a la punción. Indol + se lee al agregarle 5 gotas de reactivo de Erlich o de Kovacs, encontrando que si han degradado el triptofano y formado en anillo de Indol se coloreará el medio de color rojo.

LIA = Lisindescarboxilasa. El medio preparado es de color violeta dado por el púrpura de bromocresol. Si el medio vira a pardo es Lisin +, Si vira a amarillo es Lisin -.

Citrato de Simons = Fermentación del citrato. El medio es de color verde dado por el colorante púrpura de bromotimol. Vira de verde a azul cuando es citrato + y no hay cambio cuando es citrato negativo.

MR-VP= Rojo de Metilo- Voges Prostkauser. El medio debe hacerse en prueba doble: para MR se le adicionan 5 gotas de rojo de metilo y vira a rojo si es MR +. Para VP se adiciona alfa naftol y NaOH al 40 % .Se lee positivo por formación del anillo de color rojo.

UREA= El medio es amarillo siendo ureasa positivo al virar al rojo (KONEMAN, et al, 1987).

8. UROANÁLISIS

A través de cintas reactivas comerciales Combur10 Test® o Multisix® que permiten un diagnóstico rápido y semicuantitativo manejando hasta diez parámetros físicos como densidad y pH; químicos como bilirrubina, glucosa, cuerpos cetónicos, hemoglobina y biológicos como células tipo leucocitos y eritrocitos.

La técnica consiste en verter una gota de orina en la cinta reactiva, dejándola actuar por un minuto y luego comparar el cambio de color con respecto al patrón (DAVIDSON y HENRY, 1978). Paralelamente al examen químico se establece un análisis microscópico del sedimento el cual se realiza centrifugando en tubos capilares una cantidad de orina suficiente, y posteriormente observando si hay presencia de células y/o cristales que indiquen problemas fisiológicos y/o patológicos (DAVIDSON y HENRY, 1978; BARREIRO, 1992).



Figura 7. Cintas reactivas Combur10 Test® para uroanálisis

BIBLIOGRAFIA

- ALMAN,R.B., CLUBB,S.L., DORRESTEIN G.M., QUENSBERRY,K. 1997. Avian Medicine and Surgery. WB Saunders Company. Philadelphia.
- BANKS, W. 1981. Histología Veterinaria. Ediciones Manual Moderno.Mexico.
- BARREIRO,A. Manual de Patología Clínica Veterinaria. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá.
- DAVIDSON , I., y HENRY,J.B. 1978. Diagnostico Clínico por el Laboratorio. Edición Sexta, Editorial Salvat. Barcelona.
- DAVIES. 1984. Manual de Investigación Veterinaria Vol I y II. Edición Primera. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
- DUNN,A.M., 1983. Helmintología Veterinaria.. Edición Tercera. Editorial Manual ModernoS.A. México D.F.
- FOWLER, M.E. 1986. Zoo and Wild Animal Medicine.. Edicion Second. Edit. WB Saunders Company. Philadelphia
- GAVIÑO,G., JUAREZ,J.C., Y FIGUEROA, H.H., 1975Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo. Edición Primera. Editorial Limusa. México.
- GRIFOLS, M. Manual Clínico de Aves Exóticas. Editorial GRASS IATROS. Barcelona
- HILL, F. Y BURDICK,D., 1996. Manual for Veterinary Technicians. Houston Zoological Gardens. Houston Community College System
- KONEMAN,E.W., ALLEN, S.D., DOWELL,V.R., SOMMERS,H.M. 1987. Diagnóstico Microbiológico. Primera Edicion. Editorial Medica Panamericana. Bogotá.
- MARTINEZ,A. 1996. Manual Clínico de Reptiles. Editorial GRASS IATROS. Barcelona
- MEHLORM, H.,DUWEL, D.,REETHER,W. 1993. Manual de Parasitología Veterinaria. Editorial GRASS IATROS, Bogotá.
- MUSSMAN, C.H., y RAVE,G.V.,1978. Patología Clínica Veterinaria.. Publicación ICA Cod.10-3-001-77 Edición Unica.
- Organización Panamericana de la Salud - OPS. 1982. Manual de Técnicas Básicas para un Laboratorio en Salud. Basado en el Manual Detiene Lévy-Lambert. 198.Publicación Científica No.439 Serie Paltex. OPS
- SOULSBY,E. 1982. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Edicion Séptima, Editorial Interamericana.

- SCHALM, O.W.. 1985. Hematología Veterinaria. Edición Quinta, Editorial UTHEA. México
- SCHILLING, V.,1977.El Cuadro Hemático y su Interpretación Clínica.. Edición Quinta, Editorial Labor . S.A. Barcelona
- UHART, M.M., Y DEEM,S.L., 2000. Curso Taller sobre Medicina Veterinaria de Vida silvestre y su papel en la Conservación de la Biodiversidad. Wild Life Conservation Society. Zoológico de Cali-Colombia
- VELEZ, R.A. 1995. Guías de Parasitología Veterinaria.. Editorial Exitodinámica. Edición Segunda. Medellín Colombia.
- WIDMANN, F.K., 1981.Interpretación Clínica de las Pruebas de Laboratorio.. Edición Segunda. Editorial Jims. Barcelona.
- WALLACH, J. Y BOEVER,W. 1982. Diseases of Exotic Animals Medical and Surgical Management, Editions WB Saunders Company. Philadelphia.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN			
1.	HEMATOLOGIA	1	-
2. PROCEDIMIENTOS ESPECIALES		1	
12			
3.	QUÍMICA	16	SANGUÍNEA
4. PARASITOLOGIA GASTROINTESTINAL			
17			
5.			ECTOPARASITOS
			20
6.			MICROBIOLOGIA
			21
7.			CULTIVOS
			23
8.			UROANALISIS
			26
BIBLIOGRAFÍA			
			24