



OFICINA DE  
DIFUSION CIENTIFICA

# Universidad de Guadalajara

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Estandarización y Aplicación de Algunas Técnicas  
Especiales de Tinción Como Auxiliares  
de Diagnóstico en el Laboratorio de Patología.

Tesis Profesional

para obtener el Título de:

Médico Veterinario Zootecnista

Presenta:

Jorge Alberto Alba Muñoz

Guadalajara, Jal., Febrero de 1988.



OFICINA DE  
DIFUSION CIENTIFICA

# I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION .....	1
OBJETIVOS .....	20
MATERIAL Y METODOS.....	21
RESULTADOS .....	28
DISCUSION .....	38
CONCLUSIONES .....	43
SUMARIO .....	44
BIBLIOGRAFIA .....	45

La anatomía patológica recibió un impulso muy importante con la aparición del microscopio, ya que se tuvo así la posibilidad de poder observar la constitución fina de los tejidos y órganos. Antony Van Leeuwenhock fue el primero en descubrir el movimiento de la sangre, los eritrocitos, las fibras musculares y los espermatozoides, llamándosele por ésto Padre de la Anatomía Microscópica (14). Años más adelante (1771-1802) un catedrático francés de nombre Marie Francois Xavier Bichat (Anatomista y Fisiólogo), fue el primero en trasladar al tejido la localización de todas las enfermedades sin llegar todavía a la célula. Y no fue hasta 1858-1859 cuando Rudolf Virchow dio un avance importante dentro de la anatomía patológica ya que buscó las causas y procesos patológicos en la unidad viva, que conocía él entonces: la célula. La patología celular significó una liberación del encierro en que se encontraba la filosofía natural y el vitalismo. A fines del siglo XIX, Wilhelm Schütz, discípulo de Virchow, comenzó a orientar y a organizar la anatomía patológica a la medicina veterinaria de acuerdo con principios científicos, fue el que introdujo la histopatología como base auxiliar imprescindible en la enseñanza, en la investigación, y en el diagnóstico de las enfermedades de los animales domésticos (14), (21).



En la medicina veterinaria moderna el valor de las pruebas del laboratorio resulta un auxiliar importante para el diagnóstico definitivo de algunas enfermedades, que incluso adquieren mayor importancia, cuando los resultados se dirigen a alguna afección en especial. Así es un hecho que los progresos en diagnóstico dentro de la medicina veterinaria, posiblemente dependa por lo menos en buena parte, del uso de nuevos métodos de laboratorios. Uno de los principales métodos de laboratorio que resulta eficaz para llegar a un diagnóstico preciso, es la Histopatología, dicho método se basa en la observación de las lesiones de tejidos alterados por algún proceso morbo, desde el punto de vista microscópico.

En la actualidad es muy importante recurrir a la histopatología como medio auxiliar del diagnóstico ya que existen numerosas enfermedades que no pueden diagnosticarse con seguridad sólo por medio de la interpretación de la historia clínica o de las lesiones macroscópicas observadas a la necropsia, sino que en ocasiones es necesario conjuntar todo esto con un estudio histopatológico.

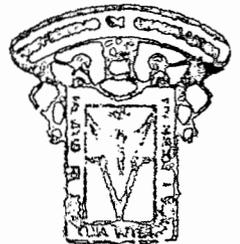
En el laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara, la técnica de tinción que usualmente se utiliza, es la de

Hematoxilina y Eosina. Los tejidos teñidos con esta técnica, se les alcanza a observar microscópicamente la localización, la forma y agrupamiento de sus células (su arquitectura celular), así como la determinación de algunas alteraciones patológicas no específicas que se pueden presentar en un sinnúmero de afecciones y ésto nos puede confundir el diagnóstico final.

Es por eso que se plantea la aplicación de técnicas especiales en el uso cotidiano del laboratorio para que se realicen los diagnósticos más precisos y específicos.

Las técnicas que se proponen son:

- A) METODO DE SUDAN IV: Técnica de tinción para la determinación de grasas neutras.
- B) METODO METACROMATICO DE KELLY: Técnica de tinción específica para hongos.
- C) METODO DE SHORR Y HEMATOLIXINA: Técnica de tinción especial para la determinación de Cuerpos de Inclusión.
- D) METODO DE SCHLEIFSTEIN: Técnica específica para la determinación de Corpusculos de Negri.



La Degeneración Grasa, es la presencia anormal de - grasa visible en la célula. Casi todas las células en proceso de degeneración contienen glóbulos lipídicos en la matriz citoplasmática y aunque esto puede considerarse degeneración -- grasa, el término se aplica constantemente a acumulaciones ma sivas que deforman la célula, se observa comunmente degeneración grasa en células que normalmente no metabolizan los lí-- pidos, es decir el hígado, riñón, el corazón (21).

La Degeneración Grasa, es causada por una gran va-- riedad de factores etiológicos. Una cantidad inadecuada de -- oxígeno es causa frecuente de esta afección y ocurre en la - anemia, ya que no existe un aporte adecuado de hemoglobina y no son transportadas cantidades adecuadas de oxígeno a los tejidos. esta puede ser causada por hemorragias severas, parásitos hematófagos, protozoarios hemáticos y hemolisis. La degeneración grasa también está asociada con diferentes trastornos -- circulatorios como son las hiperemias pasivas y crónicas, o isquemias, estas obstaculizan el transporte de oxígeno a la célula.

Otras etiologías, causantes de esta alteración son las sustancias químicas orgánicas e inorgánicas. Existe un - buen número de toxinas bacterianas y micóticas que son capa-- ces de causar una degeneración grasa, como son las salmonelo-

sis e infecciones por aflatoxinas. Hay un gran número de venenos químicos como son el cloroformo, tetracloruro de carbono y tetracloroetileno que producen este cambio, numerosas sustancias inorgánicas como es el fósforo, plomo y arsénico, así como la intoxicación por plantas como el Senecio, Astragalus y Crotalaria causan degeneración grasa.

Y por último la degeneración grasa también está asociada con alteraciones metabólicas como es la diabetes y la acetonemia (21).

Los órganos afectados por este proceso son blandos, poco consistentes, friables y con un color amarillo abigarrado (8). Microscópicamente el cambio básico es la aparición de gotas de grasa de tamaño variable en el citoplasma de la célula (19).

Como las grasas son solubles en el alcohol y xileno no aparecen en los materiales incluidos en parafina con las técnicas habituales y en la célula se observan imágenes negativas, por lo consiguiente es necesario realizar los cortes en microtomo de congelación (21).

La célula que ha experimentado degeneración grasa se tiñe pobremente con la técnica de Hematoxilina y Eosina. Las

estructuras celulares no son distinguibles y los núcleos se -  
tiñen menos, además que se puede confundir con otro tipo de -  
degeneraciones, como son la hidrópica, causada por un aumento  
del volumen celular generada por un exceso de agua intracelu-  
lar, o por una degeneración turbia o nebulosa que es también  
un aumento del volumen celular pero causada por una altera- -  
ción del metabolismo protéico. El implementar la técnica de -  
Sudan IV nos será de mucha utilidad en los casos de una dege-  
neración grasa inicial que es la que más podría confundirse -  
con una degeneración hidrópica o una degeneración turbia.

La técnica de Sudan IV es considerada como una de -  
las mejores para la determinación de lípidos, las grasas que  
se encuentran en los tejidos teñidos por este método se obser-  
van de color anaranjado o rojo.

Considero que la utilización de esta técnica nos da  
rá un enfoque directo y preciso para poder determinar una de-  
generación grasa y así llegar con más precisión a un buen - -  
diagnóstico (15),(20),(21).

El avance que ha experimentado la micología en los  
últimos 20-30 años, es debido al desarrollo de una mejor tec-  
nología dentro de la Medicina Veterinaria, así como también a  
la creciente difusión alcanzada por las micosis del hombre y

de los animales. Sin embargo los conocimientos que se tienen sobre una serie de enfermedades de los animales domésticos -- son todavía muy incompletos, la importancia de las enfermedades ocasionadas por los hongos en los animales domésticos derivan principalmente de el bajo rendimiento corporal que originan y del peligro que para la salud humana constituyen las micosis.

Bajo el concepto de micosis se incluyen las enfermedades causadas por diversas especies de hongos (17).

Los hongos son organismos vegetales que no contienen clorofila; se llaman heterótrofos porque tienen que alimentarse de otros, ya que necesitan para su alimentación sustancias orgánicas ya elaboradas por otros que sean autótrofos. Son vegetativos, pero no tienen tallo, raíces, hojas, ni flores, su cuerpo se llama talo, que puede ser unicelular o pluricelular con estructura completa, formada por membrana, protoplasma y núcleo figurado. Se desarrollan por micelos o hifas, que forman una trama o tejido y cada filamento recibe el nombre de hifa y toda la trama recibe el nombre de micelo -- que es siempre pluricelulado.

La clasificación de los hongos se basa en la producción de esporas y conidiósporas, así como en las caracteri



ticas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de sus estructuras.

De acuerdo con la localización de los hongos parásitos en el organismo hospedador, se distinguen en micosis externas o dermatomicosis y en micosis internas o micosis de los sistemas corporales (10-13).

A continuación explicaremos algunas de las principales micosis que afectan a los animales domésticos, así como las principales lesiones o alteraciones que causan los mismos:

A).- DERMATOMICOSIS O MICOSIS EXTERNAS.- Se refiere a las infecciones micóticas que afectan al pelo, las uñas, el estrato córneo, así como los tejidos subcutáneos.

1.- MICROSPORIDIOSIS: Este tipo de hongos pertenecen a los llamados hongos "Geofílicos" u hongos del suelo, afectan principalmente a caninos, felinos y suinos ocasionándoles lesiones circulares caracterizados por la pérdida de pelo, pelos rotos cubiertos por escamas y costras especialmente en los bordes de la lesión, así como la decoloración de la piel en las lesiones circulares.

2.- TRYCOPHITOSIS: Hongos que nos producen la tiña en el bovi

no y el equino, tienen afinidad por la queratina y poseen la cualidad de producir en el pelo, órganos perforadores para introducirse en el interior adelgazando cierta parte de la piel, esta zona se distingue por las lesiones circulares o de forma irregular, caracterizadas por la pérdida de pelo costras gruesas de color gris.

3.- CANDIDIASIS: Las especies del género cándida, viven como saprófitos en el intestino, boca y vagina de algunas especies, principalmente en el humano, son saprófitos también del suelo y algunos alimentos como son el queso, las frutas, los cereales, las legumbres, etc. Se caracterizan -- porque afectan a todas las especies, ocasionándoles placas blancas y gruesas así como maceración de la piel en las uniones mucocutáneas, como son la vulva, oído, ano, orificios nasales.

4.- ESPOROTRICOSIS: Hongos que lesionan principalmente al tejido subcutáneo y linfático, existiendo la formación de nódulos y granulomas esféricos duros, en el sitio de la herida o por punción del tejido tegumentario (forma de -- transmisión). Los nódulos se ulceran y drenan. En los equinos también se forman nódulos pudiéndose desarrollar a lo largo de los vasos linfáticos.

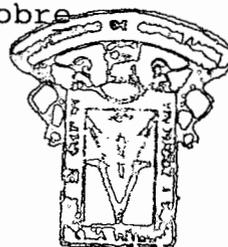


5.- RINOSPORIDOSIS: Hongos que causan una infección crónica - de las mucosas de la cavidad nasal, caracterizada por polipos que en raras ocasiones alcanzan de 2 a 3 cm., afecta principalmente a los equinos y los bovinos.

6.- FICOMICOSIS: Afecta a todas las especies, en especial a los felinos y equinos, se caracteriza por una inflamación proliferativa y crónica de la piel, así como de las membranas mucosas, en el equino, existe la presencia de granulomas no mayores de 1 a 3 cm., en la cavidad nasal y en los belfos (4),(10),(13),(17).

B) MICOSIS GENERALIZADAS: Aunque estos organismos - por lo general afectan a órganos internos, también pueden producir alteraciones en la piel.

1.- MUCORMUCOSIS: este tipo de afección es muy rara, presenta lesiones de tipo granulomatosa en ganglios linfáticos. En bovinos en gestación puede causar problemas de placentitis, determinando aborto y necrosis de los cotiledones - maternos, el material necrótico es de tipo adherente y da a los cotiledones placentarios el aspecto de estructuras de tipo acojinado amarillentos y blandos, el aborto sobreviene entre el tercero y el séptimo mes de gestación.



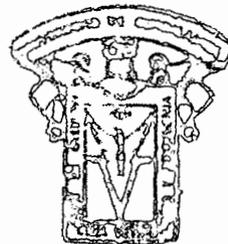
2.- ASPERGILOSIS: Los aspergillus se encuentran en el aire, la tierra, en los productos orgánicos y en muchos órganos como saprófitos, pasando a patógenos en determinadas condiciones, no son capaces de atacar un órgano sano, pero sí de desarrollarse en un órgano enfermo produciendo una infección secundaria, afectan principalmente a las aves y bovinos, causando una invasión del tracto digestivo y respiratorio, con presencia de nódulos, necrosis y ulceraciones a todo lo largo de las mucosas. En bovinos puede existir además, alteraciones en la piel con aparición de granulomas micóticos.

3.- HISTOPLASMOSIS: Este tipo de hongos afecta principalmente el sistema reticulo endotelial, que tiene la misión de defensa, causando una baja en el sistema inmune, lo cual se complica con un sinnúmero de afecciones secundarias, se encuentra en forma saprofítica en el excremento de murciélago, su puerta de entrada es el sistema respiratorio, e intestino, causando lesiones ulcerosas o focos necróticos gaseosos en pulmón, ganglios mediastínicos, ganglios bronquiales, médula ósea, bazo, hígado y riñón.

4.- ACTINOMICOSIS: Los actinomicetes viven en los animales y vegetales en forma saprofítica, y cuando se vuelven patógenos producen tumoraciones que después supuran comunican

do al exterior por trayectos fistulosos. Afectan a todas las especies, siendo más común en los bovinos, las lesiones características se presentan en la mandíbula, produciendo una osteitis supurativa (llamada mandíbula hinchada) y en muchos casos hay una producción considerable de tejido conectivo en los tejidos subcutáneos adyacentes -- existiendo descargas de un exudado purulento, grueso y amarillento.

- 5.- CRIPTOCOCOSIS: Problema que afecta principalmente a los equinos causando granulomas nasales y labiales, con presencia de lesiones mixomatosas, que se infiltran al organismo causando abscesos pulmonares.
- 6.- COCCIDIOMICOSIS: Hongos que lesionan principalmente al pulmón, bazo, hígado, ganglios mediastínicos y bronquiales, existiendo la presencia de lesiones granulomatosas con contenido purulento de color crema.
- 7.- BLASTOMICOSIS: Hongos saprofíticos de la materia orgánica en descomposición, producen una infección supurativa granulomatosa crónica en la piel, con presencia de nódulos ulcerados subcutáneos, existiendo metastasis a pulmón.

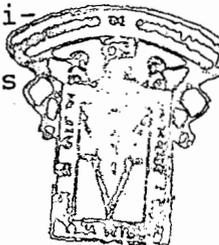


8.- NOCARDIASIS: Actúan principalmente en los canideos y felinos ocasionando nódulos cutáneos y subcutáneos, pudiendo existir nódulos pulmonares con presencia de piotorax (4), (10), (13), (17).

Obtener conclusiones sobre la especie de hongos actuantes, tomando como base el cuadro clínico, es sólo posible dentro de ciertos límites, ya se sabe que el mismo hongo puede dar diferentes formas clínicas de la enfermedad y que el mismo cuadro puede ser causado por diversas afecciones.

Por otra parte la designación de las micosis de acuerdo con directrices puramente botánicas resuelta de valor escaso para el médico veterinario, puesto que entonces no se define con precisión las alteraciones patológicas típicas (18). Aun en la observación macroscópica de las lesiones causadas por hongos nos sería difícil dar un diagnóstico ya que éstas se pueden confundir con diversas alteraciones patológicas (neoplasias, quistes, abscesos, inflamaciones, lesiones granulomatosas, etc.) o con una gran variedad de problemas que afectan la piel (13).

Cuando se aplica la técnica de hematoxilina y eosina a tejidos afectados por hongos, las estructuras micóticas



se pierden ya que se tiñen al igual que el citoplasma de las células y lo único que se observa al microscopio es una mancha de color rosa infiltrada entre los tejidos, lo que impediría precisar si se trata de un hongo o alguna otra estructura.

Al montar la técnica Metacromática de Kelly, específica para hongos, en el uso habitual del laboratorio, será de mucha utilidad para descartar las afecciones que se nos podrían confundir, además de que dicha técnica, tiñe los hongos a la perfección, pudiendo observar así la localización y forma de los mismos (12).

Los virus constituyen en grupo de agentes infecciosos caracterizados por su tamaño pequeño y su parasitismo - - obligado, se hallan ampliamente distribuidos en la naturaleza y solamente se propagan en la célula viva de plantas, animales o bacterias. Muchas de las enfermedades infecciosas de los -- animales y el hombre son producidas por virus (16).

Una característica exclusiva de ciertas virosis es la formación de cuerpos de inclusión. Durante la replicación de los virus en el interior de las células se pueden producir estructuras anormales específicas, éstas estructuras son los llamados cuerpos de inclusión.



Dichos cuerpos pueden llegar a ser mucho más grandes que las partículas virales, éstas no son mayores que los nucleolos, y pueden localizarse ya sea en el núcleo, en el citoplasma o en ambos. Para muchas infecciones virales se cree que tales cuerpos están en el proceso del desarrollo del virus. En algunas infecciones el cuerpo de inclusión puede estar formado por una masa de partículas virales, ya que dichas partículas alcanzan una madurez exacta dentro del mismo, y como último caso el cuerpo de inclusión parece ser un vestigio de la replicación viral (11),(15). Los Corpúsculos de Negri son inclusiones eosinofílicas citoplasmáticas, consecuencia de la alteración del metabolismo celular, causado por la invasión viral, éstos cuerpos de inclusión son característicos de la Rabia (15).

La presencia de cuerpos de inclusión pueden ser considerable utilidad en el diagnóstico de algunas enfermedades infecciosas, es por lo cual se explicarán algunas de las principales afecciones virales que producen cuerpos de inclusión, así como la localización de los mismos:

1.- LARINGO TRAQUEITIS AVIAR: Es una afección causada por un herpes virus, en el cual los cuerpos de inclusión se van a localizar en el epitelio que recubre la tráquea, y éstos



van a ser de tipo intranuclear.

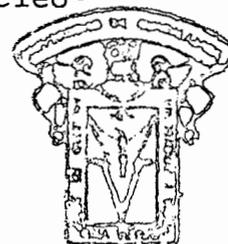
- 2.- HEPATITIS (aves y caninos): Los cuerpos de inclusión de éste tipo de problema que es causado por un adenovirus, los vamos a encontrar en el endotelio vascular y a nivel de las células hepáticas, estos cuerpos de inclusión van a ser también de tipo intranuclear.
- 3.- MOQUILLO CANINO: Es causada por un mixovirus y los cuerpos de inclusión los vamos a localizar en las células epiteliales de la vejiga, riñón, conductos biliares, cerebro (células de la Neuroglía), epitelio lingual y conjuntival, conjuntival, cojinete plantar, estómago, intestino y pueden ser citoplasmáticos e intranucleares.
- 4.- PANLEUCOPENIA FELINA: Es una afección que ataca principalmente a los gatos, existe la presencia de los cuerpos de inclusión en los epitelios de la mucosa intestinal, hígado, riñón y ganglios linfáticos.
- 5.- ENFERMEDAD DE AUJESZKY: En esta afección pueden existir ocasionalmente inclusiones eosinofílicas intracelulares en las células de la glía o en las neuronas, raras veces son observadas en bovinos, y en cerdos nunca se presentan



- 6.- GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE: Causada por un parvovirus, en la cual las inclusiones de tipo intranuclear o citoplásmico, se localizan en las células de las criptas a nivel de vellosidades intestinales y músculo cardíaco.
  
- 7.- VIRUELA: Este problema afecta a todas las especies, es causado por un paramixovirus y los cuerpos de inclusión se observan en todas las capas de la epidermis.
  
- 8.- RINONEUMONITIS VIRAL EQUINA: Ocasionada por un herpes virus, en la cual las inclusiones van a hacer de tipo intranuclear, y se van a localizar en las células hepáticas, en el epitelio bronquial y bronquialveolar, membrana nictitante y epitelio lingual (4), (6), (11), (12), (16).

La presencia de cuerpos de inclusión puede ser de considerable utilidad en el diagnóstico de algunas enfermedades de origen viral.

El empleo de la técnica de Hematoxilina y Eosina, en muchas ocasiones no puede teñir bien los cuerpos de inclusión y en ocasiones pasan desapercibidos, además que se pueden confundir con alguna otra estructura celular, como es el nucleolo.

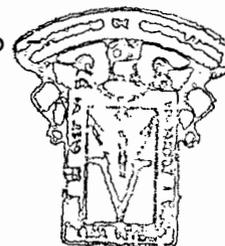


Es por eso que creo necesario implementar una técnica especial para estas inclusiones, como es la de Shorr y Hematoxilina.

La Rabia es una enfermedad infecciosa causada por un rabdovirus, en la cual existen pequeños cuerpos de inclusión, que van a estar localizados en el citoplasma de las células nerviosas.

Negri, en 1903 descubre estas pequeñas estructuras en las células nerviosas del asta de ammon y pensó que había descubierto un microorganismo que debía de incluirse dentro de los protozoos, estos tipos de estructuras se apreciaban principalmente dentro del citoplasma de las células de tejidos nerviosos de animales y humanos que habían muerto a causa de una infección rábica. Estos corpúsculos presentaban diversos tamaños, desde 1 hasta 10 ó 15, incluso mayores, hasta 27 m. y en una sola célula puede existir de 1 a 6 de estas estructuras.

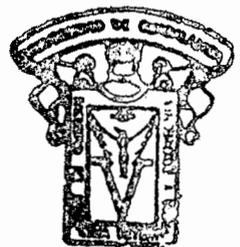
EN 1906, Babes confirma la presencia de cuerpos de negri en la rabia, y los describe como un resultado de una reacción de la infección y no como parásitos, utilizando la presencia de éstos como una prueba diagnóstica práctica para los animales rabiosos y sentó las bases para el diagnóstico



de la misma (3).

La rabia por ser una enfermedad de importancia en salud pública, requiere llevar a cabo un diagnóstico preciso, y los tejidos del S.N.C. afectados por éste problema, teñidos con la técnica de Hematoxilina y Eosina no nos remarca en sí la afección, ya que las lesiones que se alcanzan a observar - como es la degeneración o la infiltración linfocitaria, se podría confundir con una encefalitis de otro tipo, que puede ser causada por diferentes etiologías, además los corpúsculos de Negri se pueden confundir con alguna otra estructura citoplasmática, es por ello que se propone emplear una técnica desarrollada específicamente para cuerpos de Negri, dicho método de tinción es el de Schlieffstein (3),(13),(22).

El propósito de montar esta serie de técnicas en el uso cotidiano del laboratorio, es porque permitirá obtener fácilmente resultados en un tiempo más reducido, asimismo para confirmar el resultado de algún otro diagnóstico, dado por la Facultad o por alguna otra Institución, además que ayudará a descartar diversas afecciones que en la actualidad pueden causar confusión.



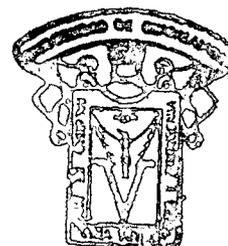
OFICINA DE  
DIFUSION CIENTIFICA

## O B J E T I V O S

OBJETIVO GENERAL: Montar y estandarizar nuevas técnicas de tinción en el laboratorio de Patología, para la realización de diagnósticos más precisos y dejar colecciones de laminillas para que se puedan utilizar en las prácticas de Patología.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Estandarizar nuevas técnicas de tinción para el diagnóstico preciso de algún problema patológico.
- Implementar al laboratorio de Patología, de reactivos, materiales y preparaciones necesarias para las nuevas técnicas de tinción propuestas a fin de que en cualquier momento puedan ser utilizadas.



OFICINA DE  
DIVISION CIENTIFICA

## MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara, y se utilizaron órganos sospechosos de Degeneración Grasa, Micosis y enfermedades virales que determinan la formación de Cuerpos de Inclusión. Estos órganos se obtuvieron de los animales que fueron remitidos al departamento para su diagnóstico en donde se les aplicó la técnica correspondiente.

### I.- METODO DE SUDAN IV.

#### INDICACIONES:

- Técnica de tinción para la determinación de Grasas Neutras (Degeneración Grasa).

#### FIJACION:

- Formol al 10%

#### SOLUCION:

- Alcohol de 70°C.                    55 cc.
- Acetona                                    50 cc.
- Sudan IV                                 A saturación

#### PROCEDIMIENTO:

- Hacer cortes del tejido por medio del microtomo de congelación.

- Teñir con hematoxilina de Harris, durante 15 min.
- Lavar con agua destilada.
- Virar con agua de la llave.
- Sumergir los cortes en Sudan IV durante 10 min.
- Lavar con agua destilada.
- Montar las piezas en glicerina.

RESULTADOS: Los lípidos infiltrados en el tejido se observan de color anaranjado a rojo.

## II.- METODO METACROMATICO DE KELLY.

### INDICACIONES:

- Método específico para la determinación de Hongos.

### FIJACION:

- Formol al 10%

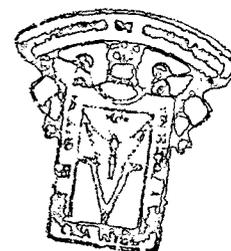
### SOLUCIONES:

#### Reactivo Sulfatoso:

- Añadir poco a poco ácido sulfúrico concentrado a un volumen igual de eter anhidro helado.

### AZUL DE TOLUIDINA:

- Azul de Toluidina 0 (C.I. 52040) .01 g.
- Acido Acético al 3 % 100.0 ml.



PROCEDIMIENTO:

- Desparafinar los cortes y pasarlos al alcohol etílico absoluto.
- Sacar los cortes en el aire de 5 a 10 minutos.
- Sumergirlo al reactivo sulfatoso 5 minutos.
- Lavar en ácido acético 1 minuto, cambiar la solución después de 10 deslizamientos.
- Teñir con Azul de Toluidina por 5 minutos.
- Lavar en ácido acético al 3% por un minuto.
- Deshidratar en alcohol etílico absoluto 1 minuto.
- Limpiar y montar.

RESULTADOS:

- Hongos.- Rojo a Violáceo.
- Fondo.- Azul Claro (12).

III.- METODO DE SHORR Y HEMATOXILINA

INDICACIONES:

- Técnica de tinción para Cuerpos de Inclusión.

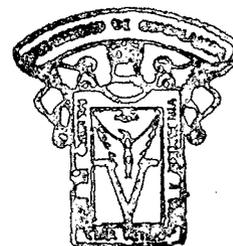
FIJACION:

- Formol al 10%

SOLUCIONES:

ALCOHOL ACIDO AL 1%

- Acido clorhídrico concentrado 1 ml.
- Alcohol etílico 99 ml.



OFICINA DE  
HISTOLOGIA CIENTIFICA

SOLUCION DE SHORR

- Alcohol etílico 50%	100.0 ml.
- Escarlata Biebrich, soluble en agua.	0.500 gm.
- Naranja G.	0.250 gm.
- Verde FCF	0.075 gm.
- Acido fosfotusico	0.500 gm.
- Acido fosfomolitico	0.500 mg.
- Acido acético glacial	1000.0 ml.

Mezclar y no usar hasta que todos los ingredientes estén completamente disueltos.

PROCEDIMIENTO:

- Desparafinar las secciones de manera usual y llevarlas al agua.
- Teñir con Hematoxilina de Harris: 3-5 minutos.
- Lavar en agua y diferencias en alcohol ácido al 1%, hasta que no haya Hematoxilina en el citoplasma de las células. Corroborar al microscopio la tinción.
- Lavar con agua e introducir las secciones en carbonato de Litio, hasta que los tejidos tomen un color azuloso.
- Lavar en agua corriente durante 10 minutos.
- Colocar las secciones en el colorante de Shorr durante 3 minutos.

- Lavar en alcohol al 95%, y corroborar en el microscopio que el tejido conectivo esté de un color verde claro.
- Lavar varias veces en alcohol absoluto y aclarar en cambios de 2 a 3, en el Xilol y por último montar en resina.

RESULTADOS:

Cuerpos de Inclusión	- Rojo Brillante
Tejido Conectivo	- Verde Brillante
Fibras Elásticas	- Rojo Púrpura
Núcleo	- Azul
Músculo	- Rojo
Queratina	- Naranja
Eritrocitos	- De naranja a rojo (12)

IV.- METODOS DE SCHLEIFSTEIN

INDICACIONES:

- Método para la determinación de corpúsculos de Negri.

FIJACION:

SOLUCION ZENKER.

Dicromato de Potasio	2.5 grs.
Bicloruro de Mercurio	5.0 grs.
Sulfato de Sodio	1.0 grs.



OFICINA DE  
ESTUDIOS CIENTÍFICOS

Acido Acético Glacial	5.0 cc.
Agua destilada	100 cc.
Fijar durante 24 hrs.	

SOLUCION:

- Fucsina Básica (C.I. 42500)	1.8 gm.
- Azul de Metilo (C.I. 52015)	1.0 gm.
- Glicerina	100.0 ml.
- Alcohol Metílico	100.0 ml.

Para su uso agregar 10 gotas de la solución a - - -  
15-20 ml. de Hidróxido de Potasio. El Hidróxido de Potasio de  
be de estar diluido en agua (1gr/40,000 ml.de agua destilada)  
Se puede utilizar también agua alcalina corriente y ésta se -  
conserva por tiempo indefinido.

PROCEDIMIENTO:

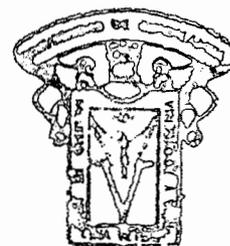
- Desparafinar e introducir las secciones en una so  
lución de 100 ml. de alcohol al 80% más ½gr.de --  
Iodo, durante 5-10 minutos.
- Lavar con agua corriente e introducir los tejidos  
en una solución de Hiposulfito d Sodio al 5% du--  
rante 5 min.
- Lavar con agua corriente e introducir los tejidos  
en un recipiente y cubrirlo ampliamente con la  
tinción (preparada).



- Calentarlo en la estufa Bacteriológica durante 15 minutos a una temperatura de 80°C. Sin dejar que la solución hierva.
- Enfriar y enjuagar con agua.
- Decolorar y diferenciar cada deslizamiento o pases por agitación en alcohol etílico al 90%, hasta que los cortes tomen un color violeta pálido.
- Aclarar y montar.

RESULTADOS:

- |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| - Cuerpos de Negri       | - Rojo magenta profundo. |
| - Inclusiones Granulares | - Azul fuerte u obscuro. |
| - Nucleolo               | - Negro azulado.         |
| - Citoplasma             | - Azul violeta           |
| - Eritrocitos            | - Color cobre (12).      |

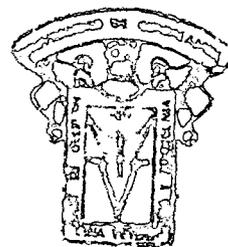


OFICINA DE  
INVESTIGACION CIENTIFICA

## R E S U L T A D O S

Al realizar las técnicas de tinción propuestas se obtuvieron los resultados, esperados para cada una de ellas. Se realizaron colecciones de tejido de algunos órganos que -- fueron dados como positivos en la técnica de Hematoxilina y -- Eosina, con el fin de comprobar la eficiencia de dichas técnicas.

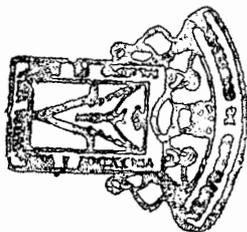
A continuación, se describen los órganos y técnicas que se utilizaron, remarcando principalmente la afección, así como algunas características resultantes de la aplicación de la técnica.



I.- METODO DE SUDAN IV

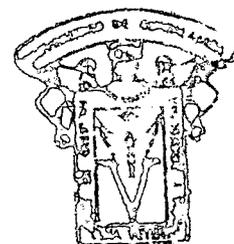
Técnica de tinción para la determinación de Grasas Neutras (Degeneración Grasa).

ESPECIE	AFECCION	ORGANO	TECNICA H y E	TECNICA DE SUDAN IV	RESULTADOS
AVE	SALMONELOSIS	HIGADO	POSITIVO	POSITIVO	Vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos de color rojo brillante.
CANINO	TOXEMIA PARASITARIA	HIGADO	POSITIVO	POSITIVO	Presencia de pequeñas vacuolas de color rojo en el citoplasma de los hepatocitos en gran cantidad.
FELINO	PROBLEMA DE ORIGEN METABOLICO	HIGADO	POSITIVO	NEGATIVO	NO SE OBSERVA
BOVINO	ENTERITIS LINFOCITARIA (PROBABLEMENTE DE ORIGEN VIRAL).	HIGADO	POSITIVO	NEGATIVO	NO SE OBSERVA
OVINO	INTOXICACION	HIGADO	POSITIVO	NEGATIVO	Pequeñas vacuolas en los hepatocitos distribuidas principalmente en la zona centrolobulillar.



La presencia de vacuolas de color rojo en el citoplasma de los hepatocitos nos indica que existe grasa no metabolizable por la misma célula, causándole así una degeneración. Los órganos que resultaron negativos a la prueba de Sudan IV, nos representan tal vez una degeneración de otro tipo que pudimos confundirla, al observarla con la técnica de Hematoxilina y Eosina.

De los casos que se pusieron a prueba se tomaron -- también muestras de tejidos de corazón y riñón (órganos que nos presentan también la degeneración grasa) para la aplicación de las técnicas resultando éstas totalmente negativas, -- aun en la técnica de Hematoxilina y Eosina.

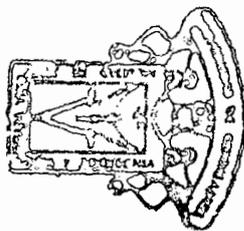


OFICINA DE  
INVESTIGACION CIENTIFICA

## II.- METODO METACROMATICO DE KELLY

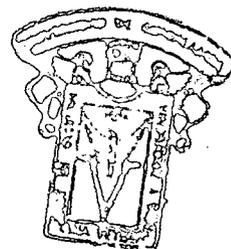
### Técnica de tinción específica para Hongos

ESPECIE	ORGANO	TECNICA H y E	METODO METACRO- MÁTICO DE KELLY	RESULTADOS
EQUINO	PIEL DELGADA	POSITIVO	POSITIVO	Hongos amorfos que se encuentran en - mayor cantidad en la epidermis, y la - dermis se encuentra ligeramente inva- dida.
EQUINO	PIEL DELGADA	POSITIVO	POSITIVO	Se encuentran los Hongos en forma fi- lamentosa invadiendo las células epi- teliales de la dermis encontrándose en mayor cantidad alrededor de los fo- lículos pilosos.
CANINO	PIEL DELGADA	POSITIVO	POSITIVO	Son Hongos circulares y semicircula-- res que invaden superficialmente la - epidermis, algunos traspasan la lámina propia.
AVE	PROVEN- TRICULO	POSITIVO	POSITIVO	Los Hongos invaden el epitelio, lámina propia y algunas porciones de la zona glandular observándose en forma de ra- mificaciones.



Los resultados obtenidos con la aplicación de esta técnica remarcán en sí la afirmación de los que se habían dado como positivos con la aplicación de la técnica usual, ésta además la certeza de que en realidad se trata de un problema de tipo Micótico.

Los hongos se tiñeron de un color violáceo oscuro, teniendo como contraste un azul claro, que es el color que tomaron las demás estructuras del tejido.

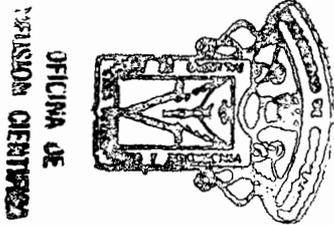


OFICINA DE  
DIFUSIÓN CIENTÍFICA

### III.- METODO DE SHORR Y HEMATOXILINA

Técnica de tinción específica para la determinación de CUERPOS DE INCLUSION.

ESPECIE	AFECCION	ORGANO	TECNICA H y E	TECNICA DE SHORR y H.	RESULTADOS
CANINA	HEPATITIS	HIGADO	POSITIVO	POSITIVO	Los Cuerpos de Inclusión son de tipo intranuclear y se observan en los Hepatocitos.
		INTESTINO DELGADO	POSITIVO	POSITIVO	Los Cuerpos de Inclusión se encuentran en los enterocitos, son de tipo intranuclear y van de 1 a 4.
		ESTOMAGO	POSITIVO	POSITIVO	Los Cuerpos de Inclusión se encuentran en las células principales del estómago, son de tipo intranuclear y citoplásmicos, van de 1 a 3
	MOQUILLO	CORAZON	NEGATIVO	NEGATIVO	NO SE OBSERVAN
		PULMON	POSITIVO	POSITIVO	Cuerpos de Inclusión citoplásmicos en el epitelio bronquialveolar.
		CEREBRO	NEGATIVO	NEGATIVO	No se observan, el núcleo se tiñe igual que los -- Cuerpos de Inclusión.



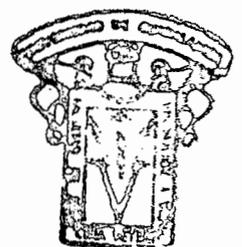
Método de Shorr y Hematoxilina (Continúa....)

ESPECIE	AFECCION	ORGANO	TECNICA H y E	TECNICA DE SHORR y H.	RESULTADOS
CANINO	MOQUILLO (continúa)	VEJIGA	NEGATIVO	POSITIVO	Cuerpos intranucleares en el epitelio de transición.
		ESTOMAGO	NEGATIVO	POSITIVO	Son intranucleares y citoplasmáticos, se encuentran en el epitelio de la zona glandular siendo de tamaño pequeño.
		HIGADO	NEGATIVO	NEGATIVO	NO SE OBSERVAN
		RIÑON	NEGATIVO	NEGATIVO	NO SE OBSERVAN
		COJINETE PLANTAR	POSITIVO	POSITIVO	Los Cuerpos de Inclusión - se observan en el epitelio papilar siendo de tipo intranuclear y citoplásmico.
		IMPRONTA OCULAR	NEGATIVO	NEGATIVO	NO SE OBSERVAN
AVE	LARINGOTRAQUEITIS.	TRAQUEA	POSITIVO	NEGATIVO	NO SE OBSERVAN
FELINO	PANLEUCOPENIA	INTESTINO	POSITIVO	POSITIVO	Los cuerpos de Inclusión - se observan de tipo intranuclear en el epitelio de las vellosidades intestinales.
SUINO	VIRUELA	PIEL DELGADA	POSITIVO	POSITIVO	Son cuerpos de Inclusión - intranuclear que van de 1 a 2 y se encuentran en el epitelio de la epidermis.

Para la realización de esta prueba se tomaron los casos sospechosos, en base a la historia clínica y en base a los resultados dados por el estudio histopatológico. Se llevó a cabo la prueba en órganos que según la literatura presentan Cuerpos de Inclusión, pero algunos resultados totalmente negativos, esto nos indica que los Cuerpos de Inclusión son representativos de cierta etapa de la enfermedad (13).

Los Cuerpos de Inclusión observados después de la aplicación de esta técnica se ven de un color rojo diferenciándose totalmente de las demás estructuras.

La aplicación de esta técnica en el cerebro no es recomendable, ya que los Cuerpos de Inclusión se tiñen del mismo color que el nucleolo, además el núcleo de la neurona necrosada se observa también de color rojo, pudiendo dar lugar a confusiones.



OFICINA DE  
FUSIÓN CIENTÍFICA

#### IV.- METODO DE SCHLEIFSTEIN

### Método específico para la determinación de Cospúsculos de Negri.

Para poder realizar esta prueba nos vimos en la necesidad de coleccionar muestras de tejidos positivos fuera de la Facultad: Se obtuvieron ratones inoculados con el virus rá- bico en los laboratorios Anchor, éstos presentaban la enfermedad en diferentes etapas y se tomaron para determinar la presencia de Corpúsculos de Negri en las células nerviosas del cerebro de acuerdo a la etapa o ciclo de la infección.

A continuación, enumeraremos los resultados obtenidos en esta prueba:

RATON	CORPUSCULOS DE NEGRI	OBSERVACIONES
A	POCOS	El animal presentaba incoordinación intermitente, depresión, indiferencia y rechinado de los dientes.
B	POCOS	Parálisis del tren posterior, temblores, conjuntivitis, movimientos torpes y depresión.
C	ESCASOS	Parálisis generalizada, yace de lado con la cabeza tensa, disnea y reacción a los estímulos externos con ataques epilépticos.
D	ESCASOS	Animal en estado de coma.
E	ESCASOS	Muerto.
* F	ABUNDANTES	Muerto.

\* Ratón inoculado con virus de campo.



Los Corpúsculos de Negri se observan de tamaño variable y tienden a ser en su mayoría pequeños, varios se encuentran en el centro del citoplasma y algunos en el borde de la membrana celular. Estos corpúsculos se tiñen de color rojo magenta y se diferencian totalmente del citoplasma, ya que éstos se tiñen de un color violáceo. De acuerdo al porcentaje de neuronas afectadas, se tomó como valor para determinar a los Corpúsculos de Negri, escasos cuando es menos del 5% de neuronas, pocos cuando es el 15 a 20 %, muchos 50 %, abundante cuando más del 80 % está afectado.

También se observó que existían mayor número de Corpúsculos de Negri en ratones que se habían inoculado con el virus del campo, que los que se habían inoculado con el virus del laboratorio, ésto debido a la modificación del virus.



## D I S C U S I O N

La discusión de este trabajo experimental, consta sólo de un relato sobre los problemas a los que nos enfrentamos para lograr la estandarización de cada una de las técnicas y de cómo se solucionaron los problemas.

También enumeraremos la importancia de la aplicación de estas técnicas, en base a las ventajas que ofrecen, en comparación de los métodos de laboratorio más usuales.

Es frecuente tener fracasos al intentar realizar algunas técnicas, aunque nos apeguemos a la metodología sugerida por el manual, ésto se debe en parte al grado de pureza del material empleado, siendo el primer obstáculo para la obtención de buenos resultados. Hay que tomar en cuenta que cada tejido tiene sus variantes exclusivas ante los reactivos empleados, por lo tanto el constante manejo de la técnica, el conocimiento y la acción de los reactivos es lo que va dando la pauta adecuada para cada método.

Al realizar la técnica de Sudan IV, técnica específica para determinar Degeneración Grasa, fue necesario cambiar totalmente el procedimiento de la técnica que se había descrito anteriormente debido a que los tejidos perdían cohe-

sión y se deslizaban fuera del portaobjeto cuando se le aplicaba el etilenglicol, además de que existía poca absorción de Hematoxilina y la grasa se teñía pobremente. La técnica se -- cambio tomándose como base otro tipo de metodología a la cual se le modificó los tiempos de exposición en la Hematoxilina a 15 minutos y en tinción de Sudan IV a 10 minutos. La estructura arquitectónica de las muestras positivas no se observan -- con detalle por el grosor del tejido, pero las grasas se tiñieron a la perfección, indicándonos con ésto sin duda alguna, la degeneración.

Para la identificación de la Degeneración Grasa no existe ningún otro método más que la aplicación de un estudio Histopatológico, siendo la técnica de Sudan IV la más práctica ya que el resultado se obtiene en un tiempo mínimo de 2 horas.

En el Método Metacromático de Kelly, el color rojo a violáceo dado por el colorante Azul de Touluidina no fue tomado por los hongos, por lo que se aumentó el tiempo de exposición en la tinción de 5 a 8 minutos.

Los resultados que se obtuvieron con la aplicación del Método Metacromático de Kelly, nos representa en sí la especificidad de la técnica, asimismo nos indica la forma y lo-



calización de las estructuras micóticas, mas no nos identifica en forma concreta al tipo de hongo que se trata. Es por lo consiguiente que recomendamos la aplicación del Cultivo de Sabouraud el cual nos especificará el tipo del hongo en base a la observación de sus características morfológicas durante su desarrollo y en un intervalo de tiempo de 6 a 30 días dependiendo del hongo actuante.

El tiempo que se estableció para la determinación del hongo, por medio de la utilización de esta técnica de tinción fue de 32 horas, después de la recolección del tejido sospechoso.

En el Método de Shorr y Hematoxilina, el tiempo para lograr una buena penetración del colorante de Shorr es de 3 minutos, 2 minutos más de lo establecido,asimismo se suplió el agua amoniacal por otro tipo de solución alcalinizante, como es el carbonato de litio, esto debido a que no se pudo obtener el material propuesto para esta solución.

El examen Histopatológico en el cual se incluya el Método de Shorr y Hematoxilina, no poseé la sensibilidad del aislamiento vírico, pero la identificación de los cuerpos de inclusión pueden ser útiles en el diagnóstico y de ayuda inmediata para el Médico Veterinario; aunque ésto no es eminente,



ya que los cuerpos de inclusión son representativos de cierta etapa de la enfermedad, por lo cual la afección que se preten de diagnosticar puede resultar en dado caso negativa (13). Los resultados se obtienen en un tiempo mínimo de 36 horas con la aplicación de esta técnica.

En la aplicación de la técnica de Schleifstein, al fijador se le cambió el bicloruro de mercurio por cloruro de mercurio sin que esto presentara algún cambio. Fue necesario también de exponer las laminillas antes de teñirse en una solución Iodada durante 10 min., con el fin de retirar los cristales de mercurio y después en una solución de hiposulfito de sodio para retirar los cristales de Iodo. También fue necesario colocar las laminillas en un recipiente, se cubrió ampliamente con la tinción y se colocaron dentro de la estufa bacteriológica a una temperatura de 80°C con un tiempo de 15 min., ésto con el fin de suplir la parrilla eléctrica, que se debería utilizar para poder calentar la solución.

Para la determinación de Corpúsculos de Negri con la técnica de Schleifstein se lleva un término de 38 hrs., ésta técnica no es la más exacta ya que Schleifstein, hizo una modificación de la técnica de Sellar (3), por lo cual tiene un 80% de especificidad; pero ésto depende de la presencia de



FRASE DE  
CIENTÍFICO

Cospúsculos de Negri, ya que no todos los animales muertos -- por una infección rábica los presentan, no sustituyen a la técnica de Inmunofluorescencia, ni a la inoculación de animales que son métodos más específicos; pero, sí se puede tomar en cuenta para reafirmar algún resultado que haya quedado en duda (13).

Ya que los Corpúsculos de Negri son cuerpos de inclusión virales, pensamos que la aplicación de esta técnica a órganos sospechosos de enfermedades virales que produzcan -- Cuerpos de Inclusión nos daría buenos resultados; pero los tejidos que se pudieron a prueba resultaron totalmente negativos, probando con ésto que la técnica de Schleifstein es específica para cuerpos de Inclusión acidofílicos característicos de la Rabia y no es útil para otras enfermedades (22).



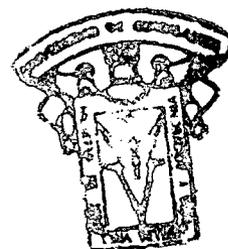
## C O N C L U S I O N E S

1.- Se logró la completa estandarización de las cuatro técnicas de tinción propuestas. Las técnicas que se estandarizaron son:

- A).- METODO DE SUDAN IV.- Técnica de tinción para la determinación de grasas neutras.
- B).- METODO METACROMATICO DE KELLY.- Técnica de tinción específica para hongos.
- C).- METODO DE SHORR Y HEMATOXILINA.- Técnica de tinción para la determinación de Cuerpos de Inclusion.
- D).- METODO DE SCHLEIFSTEIN.- Técnica específica para la determinación de corpúsculos de Negri.

2.- Se reafirmaron los diagnósticos dados por este y otros departamentos de la misma Facultad, asimismo los de otras Instituciones.

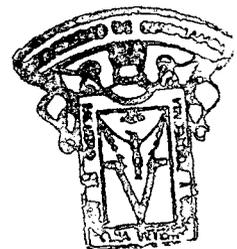
3.- Se comprobó que el uso de otras técnicas de tinción en los diagnósticos histopatológicos, nos auxilian para la obtención de buenos resultados.



## S U M A R I O

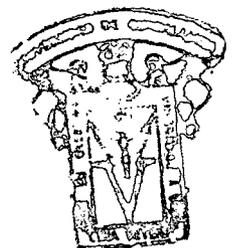
Se utilizaron muestras de tejidos de diferentes órganos afectados por enfermedades que causan Degeneración Grasa, Micosis y Cuerpos de Inclusión virales.

Se estandarizaron cuatro diferentes técnicas de tinción para lograr un diagnóstico definitivo más certero, así como una mejor enseñanza práctica de la Histopatología. Las técnicas estandarizadas fueron: Técnica de Sudán IV, Técnica Específica para la determinación de grasas neutras (Degeneración Grasa), Método Metacromático de Kelly, Técnica de Tinción específica para hongos, Método de Shorr y Hematoxilina, Técnica de Tinción para la determinación de Cuerpos de Inclusión Virales y la Técnica de Schleifstein, método especial para la determinación de Corpúsculos de Negri.



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

- 1.- Acton, Kucera, Myrvik, Weiser, FUNDAMENTAL OF MEDICAL - -  
VIROLOGY, Lea-8 Febiger, Philadelphia 1972.
- 2.- Ann Preece, A MANUAL FOR HISTOLOGIC TECHNICIANS, Third --  
Edition, Little Brown and Company, Boston 1972.
- 3.- Baer y Col George, RABIA, Primera Edición, Ediciones la -  
Prensa Médica, México, D.F. 1982.
- 4.- Blood, Henderson, MEDICINA VETERINARIA, Cuarta Edición, -  
Editorial Interamericana, México, D.F., 1974.
- 5.- Busby, House and Mc.Donald, VIROLOGIAL TECHNIQUE, Little  
Brown and Company, Londres 1964.
- 6.- Correa Girón Pablo, ENFERMEDADES VIRALES DE LOS ANIMALES  
DOMESTICOS (MONOGASTRICOS), Cuarta Edición, Volumen I, -  
UNAM 1982.
- 7.- Disbrey, Rack, HISTOLOGICAL LABORATORY METHODS, Livistone  
1970.
- 8.- Dos Santos Andrade, PATOLOGIA GENERAL, Segunda Edición, -  
Editorial Interamericana, 1984.
- 9.- Estrada, Peralta, Rivas MANUAL DE TECNICAS HISTOPATOLOGI-  
CAS, Primera Edición A G T Editor, México 1982.
- 10.-Estrada Camuz José, LAS MICOSIS O FUNGOSIS EN LA MEDICINA  
Y VETERINARIA. Primera Edición, Editorial Jims, Barcelona  
1970.
- 11.-Fenner, Mc. Auslan, Mims, Samdrook y Withe, THE BIOLOGY -  
OF ANIMAL VIRUSES, Third Edition, Volumen I, Academic - -  
Press, New York 1969.



- 12.- Gretchen L. Humanson, ANIMAL TISSUE TECHNIQUES, Fourth -- Edition Wh. Freeman and Company, San Francisco 1972.
- 13.- Hagan y Bruner, ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LOS ANIMALES DOMESTICOS. Cuarta Edición, Ediciones Prensa Médica 1980.
- 14.- K. Pokel, TRATADO DE ANATOMIA PATOLOGICA, Editorial Acriba, Zaragoza, España 1975.
- 15.- K.V.F. Jubb, Kenedy, PATOLOGIA DE LOS ANIMALES DOMESTICOS, Primera Edición, Tomo II, Editorial Labor.
- 16.- Merchart, Parker, BACTERIOLOGIA Y VIROLOGIA VETERINARIA. Tercera Edición, Editorial Acriba, Zaragoza España 1975.
- 17.- MANUAL MERK VETERINARIA. Primera Edición Merk an Co. Inc. Rahwau N.J., USA. 1981.
- 18.- Neundorf, Seidel, ENFERMEDADES DEL CERDO, Tercera Edición, Editorial Acriba, Zaragoza, España 1979.
- 19.- Norman F. Cheville, PATOLOGIA CELULAR, Editorial Acriba, Zaragoza, España 1980.
- 20.- Ogilvie F. Robertson HISTOPATOLOGIA, Quinta Edición, Editorial Interamericana, México, D.F. 1979.
- 21.- Runnells Russell A., Monlux S.W. Monlux W.A., PRINCIPIOS DE PATOLOGIA VETERINARIA, Primera Edición, Editorial Continental, México D.F. 1980.
- 22.- World Health Organisation, LABORATORY TECHIQUES IN RABIES, Third Edition, Geneva 1973.



OFICINA DE  
DIFUSION CIENTIFICA