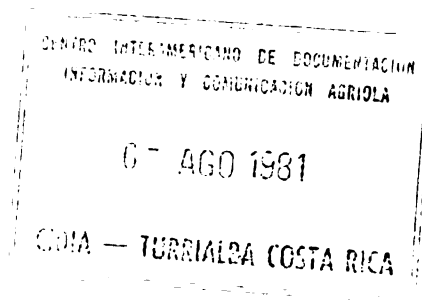


**NOTAS SOBRE LAS TECNICAS DE FISTULACION
AL RUMEN Y DUODENO EN BOVINOS Y PROCEDIMIENTOS**

AFINES DE LABORATORIO



MANUEL E. RUIZ, PH.D.*

30 DE SETIEMBRE, 1980

* Nutricionista, Programa de Producción Animal, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. Se agradece al Ing. Danilo Pezo, Asistente de Investigación del CATIE, por la revisión del material y por la preparación de uno de los capítulos de este documento.

C O N T E N I D O

A.	Notas sobre técnicas quirúrgicas.....	1
B.	Métodos de esterilización de equipo.....	9
C.	Procedimiento para la fistulación del rumen.....	11+
D.	Procedimiento para la fistulación del duodeno.....	16
E.	Determinación de la digestión ruminal, <u>in situ</u> utilizando la técnica de la bolsa de dacrón.....	20
F.	Procedimiento para el método de dos etapas en la determinación de la digestibilidad de la materia orgánica de los forrajes.....	23
G.	Determinación del glicol polietileno (PEG) 4000 en la sangre y otros fluidos.....	36
H.	Determinación del glicol polietileno (PEG) en contenido abomasal e intestinal.....	40
I.	Determinación del N total en orina.....	44
J.	Determinación del N total en jugo ruminal.....	46
K.	Determinación del N total en jugo ruminal centrifugado (JRC).....	47
L.	Determinación del nitrógeno no proteico (NNP) en jugo ruminal.....	48
M.	Determinación de proteína (método de la tirosina).....	50
N.	Determinación de proteína (método del biuret).....	52
O.	Procedimiento para la determinación de ácido láctico en fluido ruminal.....	54
P.	Algunas direcciones y datos útiles para prepararse en la ejecución y utilización de fístulas.....	57
Q.	Fuentes bibliográficas de importancia en el campo de cirugía nutricional y su uso en la investigación.....	59

NOTAS SOBRE TÉCNICAS QUIRÚRGICAS*

Manuel E. Ruiz, Ph.D.

A. Reglas básicas

1. En ningún momento debe violarse la condición de asepsia. En caso que esto ocurra, debe remediarse de inmediato. Esto puede ser en la forma de cambio de guantes, desechando toallas sucias o contaminadas y poniendo nuevas o desechando instrumentos contaminados.
2. Las incisiones deben hacerse con cuchillas filosas, nunca con tijeras pues estas muelen la piel y demora la cicatrización.
3. Todas las incisiones deben tener un tamaño suficiente para permitir un acceso libre al área de cirugía. Tampoco deben hacerse de un tamaño excesivo que redundará en una demora innecesaria de la operación.
4. Las incisiones deben efectuarse respetando los nervios y evitando causar traumas innecesarias al suministro sanguíneo y a los músculos.
5. Las incisiones deben ser limpias y con decisión de tal manera que se pueda llegar al área deseada sin causar daños innecesarios a las estructuras adyacentes.

* Seleccionadas de varias fuentes bibliográficas.

6. Los tejidos, incluyendo la piel, no deben ser socavados innecesariamente.
7. Toda vez que sea posible deben usarse las divisiones naturales de la fascia para avanzar hasta las estructuras de interés.
8. El tejido debe manipularse con delicadeza y no deben aprisionarse con fórceps, pinzas, etc. innecesariamente. Los estirones y desgarres del tejido demoran la curación y pueden causar adherencias.
9. Las incisiones deben cerrarse capa por capa. Ocasionalmente se puede aceptar la sutura de más de una capa junto a la que está sobre ellas.
10. Debe tenerse cuidado de no dejar espacios vacíos durante la finalización de una sutura de incisión.

B. EL MANEJO DE LOS INSTRUMENTOS

1. Nunca debe sostenerse un bisturí como si fuera un lápiz. El mango es largo y permite que se pueda sostener firmemente en la palma de la mano, colocando el dedo índice sobre la base de la "espina" de la hoja. No debe pasarse repetidas veces sobre el tejido excepto cuando se trate de disecciones muy delicadas.
2. En contraste, los fórceps pulgares y tisulares nunca deben sostenerse en la palma de la mano. Estos comúnmente se sostienen en la mano opuesta de la que está "operando" pero se asen como si fueran lápices.

3. Las tijeras y los fórceps hemostáticos se sostienen con el pulgar en una de las "orejas" y el dedo medio en la otra "oreja". Luego se coloca el dedo índice (de la misma mano) sobre la unión de las dos partes del instrumento y es este dedo el que guía con precisión el fórceps al punto de hemorragia. Sólo debe atraparse la puntita del vaso sangrante. Los fórceps curvados se usan con la punta con una orientación diagonal al vaso sangrante y no en forma paralela ni en cruz al vaso.

C. HEMOSTASIS (algunos métodos)

1. Ligación. Después de ocluir un vaso hemorrágico usando un hemostático, el vaso se liga. Se prefiere el uso de "cut-gut" corriente.
2. Presión. En ciertas áreas a veces es posible causar hemostasis aplicando una presión suave, pero firme, con una esponja. Hemorragias de vasos capilares pequeños se pueden controlar con este método durante el ingreso en una incisión quirúrgica. Este control lo hace tanto el cirujano como el asistente durante el curso de una operación.
3. Electrocauterización. Las hemorragias capilares pueden controlarse fácilmente usando electrocirugía y así se logra un área de cirugía totalmente libre de sangre. Las pequeñas arteriolas y vénulas se ocluyen con las puntas de fórceps tipo mosquito y la terminal activa luego se toca con los fórceps. Los vasos de más de 1 mm de diámetro no deben cauterizarse. La hemostasis mediante corriente eléctrica no debe tomar más de 1 segundo.

4. Sutura. La suturación del tejido que rodea al vaso sangrante puede ser suficiente para ocluir vasos pequeños.
5. Aplastamiento. Cuando los puntos hemorrágicos son pequeños, a veces se logra un control efectivo a la oclusión temporal con fórceps.

D. ANESTESIA

1. Anestesia general. La siguiente información se ha extraído de la tesis M.S. de L. L. Jackson, Iowa State University, 1971, y se refiere al uso del gliceril guaiacolato. Título de la tesis: "Clinical and hematological evolution of glyceryl guaiacolate as an adjuvant to anesthesia in the horse".

El gliceril guaiacolato (3- (o-metoxi fenoxi)-1, 2 propanediol) es un polvo blanco cristalino soluble en agua, alcohol, glicerina y glicol propileno. En forma selectiva deprime la transmisión de impulsos nerviosos en las neuronas internunciales del cordón espinal, el tallo cerebral y las áreas subcorticales del cerebro. Tiene mucho menos acción deprimiente sobre la función cardiopulmonar que el cloruro de succinilcolina. Un modo normal de administración para la inducción de anestesia es usando una solución de 5% de gliceril guaiacolato en combinación con una solución de 0.2% thiamilal sódico dado por vía intravenosa. La dosis de esta solución necesaria para la reclinación de rumiantes mayores es de 1 ml/lb de peso vivo.

(M. Westhves y R. Frithch. Animal anesthesia: general anesthesia. D. B. Lippincott, Co., Philadelphia, Pennsylvania. 1965). Los reflejos oculares estándares son de poco uso en la determinación de la profundidad del estado anestésico en la vaca. En vez de esto, a medida que el relajamiento se hace más profundo, el ojo se empieza a

ver en una dirección opuesta al movimiento de las manecillas del reloj, al principio en una orientación dorsal y luego en una orientación ventral, para finalmente retornar a su posición central cuando la vaca ya entra bajo el efecto total de la solución.

Anotaciones a raíz de comunicaciones con el personal del Colegio de Veterinaria de la Iowa State University:

Disuelva surital en la solución de gliceril guaiacolato justo antes de usarlo.

Después de la inducción anestésica, cambie a una solución que sólo contenga gliceril guaiacolato.

Anotaciones del libro de Lumo: "Textbook of Veterinary Anesthesia":

La cesación de la respiración es común al principio de aplicación de la anestesia si se usa surital. Esta no es una situación de peligro a menos que se haya usado una dosis muy grande. La acumulación de CO₂ es un estímulo suficiente para los centros respiratorios bajo circunstancias comunes.

2. Anestesia local. El Dr. Dore McGilliard, del Animal Science Department, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A. indica que comúnmente se usan cualquiera de los siguientes 3 anestéticos:

- a. Procaína. Tiene difusión lenta.
- b. Xylocaína, 2%. Es preferido; para una fistulación ruminal se usan unos 50 cc.
- c. Lidocaína. De igual eficacia que la xylocaína.

E. SUTURAS

Tanto el procedimiento para hacer nudos como los más comunes patrones de costura quirúrgica se ilustran en las siguientes dos páginas reproducidas de un libro sobre cirugía.

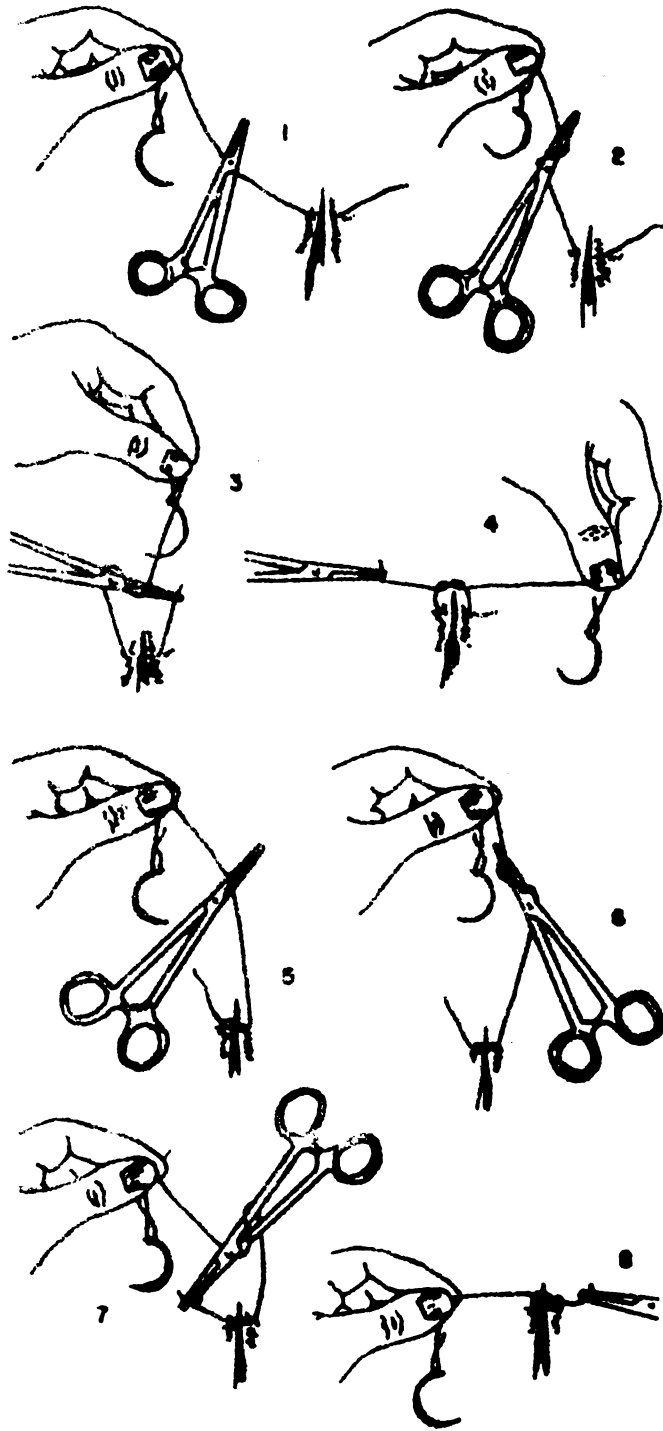
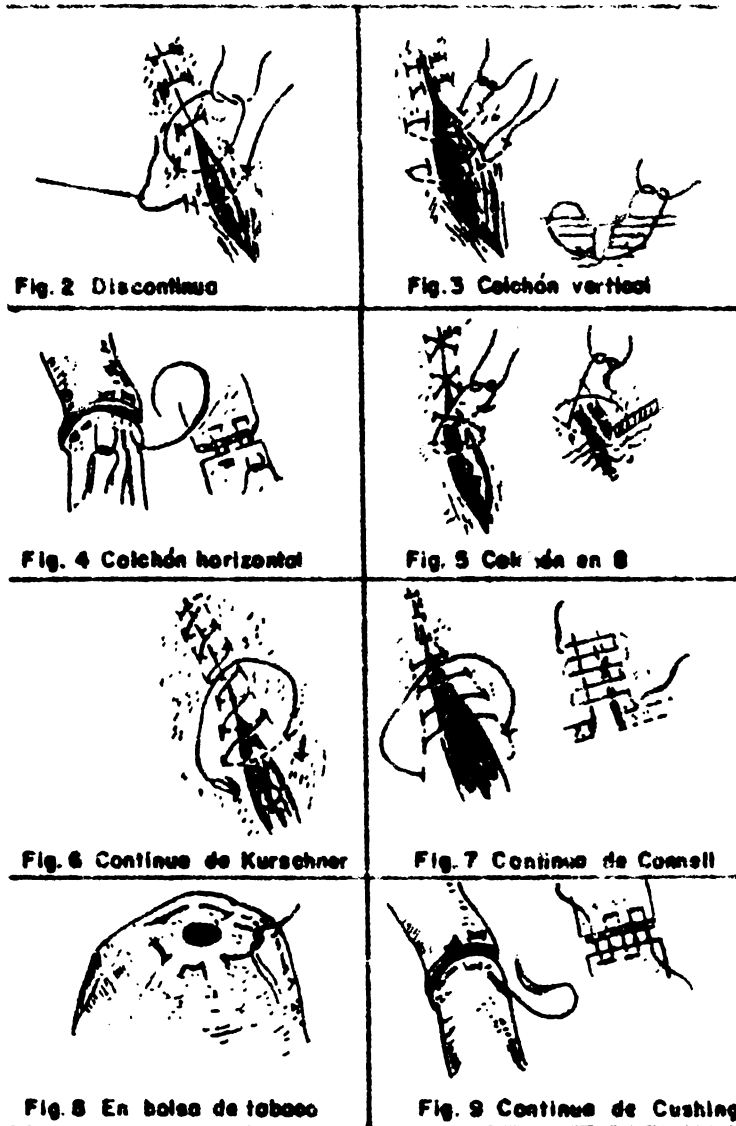


Fig.1 La técnica del Nudo de Greig



Figs. 2 a 9 Tipos de suturas

METODOS DE ESTERILIZACION DE EQUIPO

Manuel E. Ruiz, Ph.D.

1. Esterilización en frío

1.1. Instrumentos metálicos

Los tornillos de los instrumentos se oxidan aunque éstos sean de acero inoxidable . También las tijeras, cuchillas y otros instrumentos cortantes pierden su filo si se someten a calor. Para la esterilización del instrumental quirúrgico se recomienda usar Zephiran cloruro (cloruro de alquilbenzildimetilamonio 17%, agua y 2% de etanol al 83%). Use una onza de este producto por galón de agua. Esta solución debe colocarse en la bandeja que contiene los instrumentos quirúrgicos. Añadir el equivalente de dos cucharaditas/gal de un antioxidante el cual puede ser preparado mezclando una parte de nitrato de sodio más dos partes de bicarbonato de sodio. Los instrumentos se dejan 4 horas en la solución.

1.2. Gasas

Usar una parte de etanol al 70% más una parte de agua (mezclar), añadir una onza de Zephiran por galón de esta mezcla. La mezcla resultante es amarillenta lo que sirve para diferenciarla de la otra.

En caso de no encontrar un desinfectante como Zephiran cloruro sólo usar una solución de etanol, al 70%, aunque su efectividad es mucho menor .

2. Autoclave

Se puede usar para esterilizar paños, gabachas, mangos de bisturíes, y otros instrumentos no cortantes y que no tengan tornillos.

Las condiciones adecuadas son: 120°C a una presión de 1kg/cm² durante 40 minutos. Otra combinación de condiciones, para una esterilización más rápida, es de 130°C a una presión de 2 kg/cm² y por 3 minutos.

3. Calor seco

Este es un método adecuado solamente para instrumentos metálicos no cortantes (el calor hace perder el filo de los instrumentos cortantes). La esterilización se lleva a cabo aplicando 190°C de temperatura durante 15 minutos.

4. Hervido

Tanto los instrumentos metálicos como equipo de vidriería se pueden desinfectar hirviéndolos durante 30 minutos. Las esponjas y telas necesitan hervirse por 45 minutos.

PROCEDIMIENTO PARA LA ESTERILIZACIÓN DEL BÚVIDO*

Manuel E. Ruiz, D.V.M.

A. Equipo quirúrgico

1. Bisturí
2. Tijeras
3. Tres agujas medio circulares, con bordes cortantes
4. Sutura (seda, trenzada, No.2)
5. Fórceps largos para coser
6. Pinzas para sostener el peritoneo, la pared ruminal, la piel
7. Dos fórceps especiales para sostener la pared ruminal
8. Gasa
9. Tijeras para cortar suturas

B. Procedimiento

1. Afeite el área posterior a la 13a. costilla, parte superior, lado izquierdo del animal (el ijar o flanco del mamífero, Fig. 10).
2. Insensibilice la piel inyectando 20 cc de xilocaína a lo largo del borde posterior de la 13a. costilla y 10 cc a lo largo del borde inferior del hueso del lomo (Fig. 10).
3. Enjabone el área y cepille
4. Use gasa estéril, mojada con una solución de Equinam, para limpiar el área.

* Basado en un entrenamiento recibido en Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A., a cargo del Dr. Dare McGilliard.

5. Saque el fémur con gasa.
6. Recíele el área con una solución de yodo al 3%.
7. Trace una línea de incisión vertical de 5 1/2 pulgadas (14 cm) exactamente en medio de la tesa, tan alto como sea posible (sin tocar el hueso del lomo) (Fig. 10).
8. Con el bisturí corte la piel de un solo tajo siguiendo la línea trazada. Habrán algunas hemorragias pequeñas. Séquelas con gasa.
9. Proceda a cortar la fascia. No corte el músculo.
10. Aplique anestesia, unos 10 cc a través del corte en la fascia, es decir, a través del músculo que ya se muestra, parando la aguja al tocar el peritoneo.
11. El músculo externo tiene sus fibras orientadas horizontalmente (el animal está parado) o casi horizontalmente. Penetre el músculo con unas tijeras puntiagudas, luego proceda a hacer una disección roma abriendo las hojas de la tijera. Más adelante puede separar más las partes del músculo usando las manos. Abra tanto como sea posible.

Debajo del músculo externo hay otro cuyas fibras corren de la dirección del nacimiento de la cola hacia las patas delanteras. Haga lo mismo que se indicó para la disección del músculo externo, halando las partes separadas tanto como sea posible (Fig. 11).

Si la abertura no es suficientemente grande para albergar la cánula tal vez tenga que tijeretear un poco el músculo externo.

12. Con los fórceps levante el peritoneo, luego con la tijera corte un pequeño hueco que le permita colocar la tijera con sus hojas casi cerradas para luego empujar hacia arriba cortando así el peritoneo con mínimo daño

y hemorragia. Proceda de igual manera hacia abajo. El total de corte del peritoneo debe ser 5 1/2 pulgadas (14 cm). Una vez cortado el peritoneo aparece el lado seroso del rumen.

13. Coja el extremo superior de la línea proyectada de incisión del rumen con un fórceps. Haga lo mismo con el extremo inferior.
14. Cosa el extremo superior de la incisión en la piel, pasando una vez a través de la piel y luego a través de la capa muscular del rumen situada en el mismo nivel; luego vuelva a pasar la aguja por debajo de la piel en el lado opuesto de la incisión. Haga un doble lazo y anude. Luego un lazo simple y anude usando un nudo de cuadro. Otra vez un lazo simple y anude en cuadro (Fig. 1). Corte la sutura.
15. A 1/8 de pulgada del borde de la piel cortada y a una distancia de unos 7mm de la sutura inicial, pase la aguja a través de la piel, luego a través del músculo ruminal y hacia afuera a través de la piel en el mismo lado, a 1/8" del borde. Anude según se indicó en el inciso anterior. Corte la sutura. Haga el siguiente a 7mm de distancia. Continúe así hasta llegar al extremo inferior de la incisión. En este punto, proceda según se indicó en el inciso 14 (Fig. 12).
16. En el otro borde de la incisión, proceda como se explicó en el inciso 15, teniendo cuidado de dejar suficiente luz en la abertura del rumen entre ambas líneas de puntos a fin de permitir el albergue de la cánula.
17. Asegúrese que el borde de la piel no se doble y que, así, haga contacto la piel con la pared externa del rumen. También asegúrese que el cosido de la piel al rumen sea pareja y que no se formen pliegues ya sea del rumen o de la piel, pues estos pueden ser focos de infección una vez que se

abra el rumen y el contenido ruminal contamine dichos pliegues. Fácilmente puede ocurrir peritonitis por este problema.

18. Una vez que todo esté cosido, con el bisturí haga un corte limpio a través de la pared ruminal; luego con la tijera corte hacia arriba y hacia abajo dentro de los confines dictados por los puntos (Fig. 12).
19. Durante toda la operación, la cánula se debe haber mantenido en agua caliente a fin de ablandarla. Saque la cánula, hale un lado hacia afuera a través de la abertura de tal modo que se forme un cono lo que permitirá su inserción al rumen. Inserte la cánula en la fístula, empujando con firmeza hasta el tope natural de la cánula. Luego empuje el lado que se había vuelto hacia afuera hasta que la cánula se encuentre completa y uniformemente extendida dentro del rumen. Este proceso puede tomar tiempo y esfuerzo.

Cuando se haya colocado la cánula en posición normal, coloque temporalmente (por 8 días) un tapón en el hueco de la cánula. Se puede usar un tarro o un cono truncado de madera.
20. Rocíe con un bactericida. Un buen producto, llamado Topazol, parece que ya no existe en el mercado. Use algo similar si no se encuentra Topazol.
21. Asegure el tapón temporal en su lugar usando una cinta adhesiva, del tipo flexible, rodeando al animal más de una vez (depende de la anchura del "tape" o cinta). Esto prevendrá contra la pérdida o caída accidental del tapón.
22. Una semana más tarde se puede colocar el tapón propio de la cánula. El animal debe recibir antibióticos todos los días en la primera semana posoperativa.

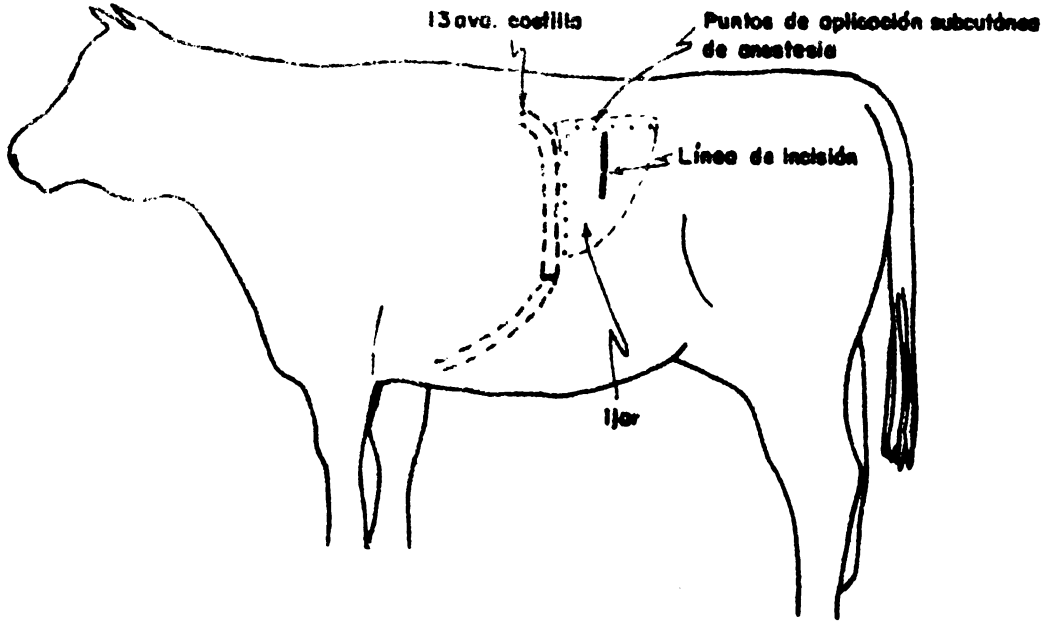


Fig.10 Area de fistulación ruminal en el flanco izquierdo del rumiante

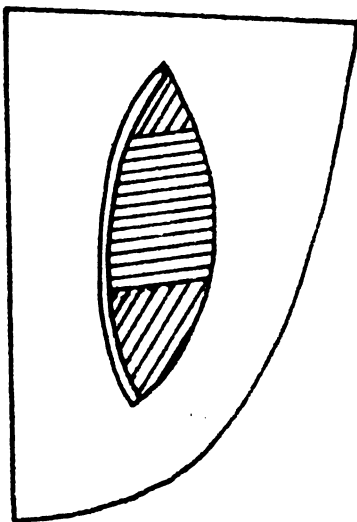


Fig. 11 Músculos debajo de la piel que deben disectarse por separación

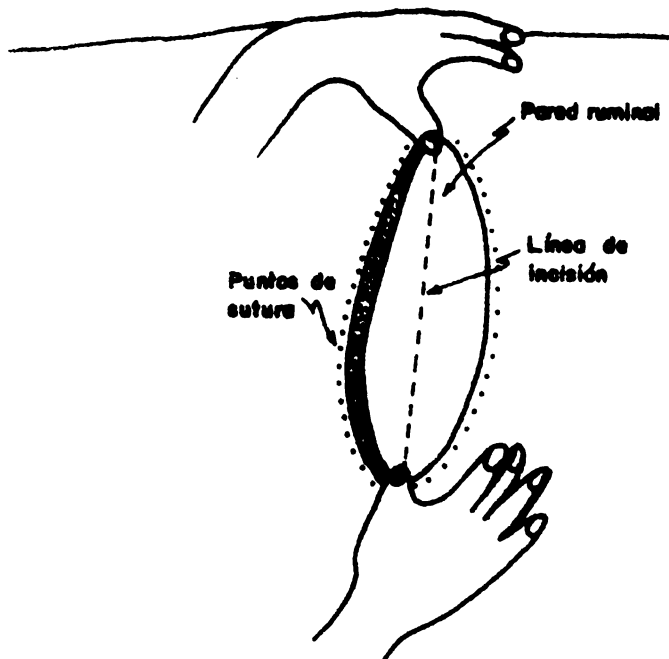


Fig. 12 Empujar bien los músculos, mostrando totalmente la pared externa del rumen antes de suturar y hacer la incisión del rumen

PROCEDIMIENTO PARA LA FISTULIZACION DEL DUODENO*

Manuel E. Ruiz, Ph.D.

A. EQUIPO QUIRURGICO

1. Máquina de afeitar
2. Bisturí
3. Tijeras
4. Hemostatos
5. Periostótomo
6. Fórceps
7. Sutura de seda SH tipo O (incluye aguja)
8. Sutura de seda No. 2
9. Gasa estéril
10. Perforador de tapones tamaño 12 u 11
11. Perforador de tejido, acero inoxidable, tipo T
12. Cono metálico para la exteriorización de cánula.
13. Agujas de medio círculo, sin bordes cortantes y con bordes cortantes

B. PROCEDIMIENTO

1. Afeite el área sobre la 12^a costilla, lado derecho del animal. Limpie bien el área. El animal debe estar preferentemente bajo anestesia general.
2. Corte la piel desde la curvatura inferior de la costilla hasta su unión con el cartílago correspondiente extendiéndose ligeramente más hacia el vientre.

*Basado en instrucciones prácticas recibidas en Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A. bajo la dirección del Dr. Dare McGilliard.

- Haga el corte exactamente sobre la línea media de la costilla.
3. Con la tijera semi-cerrada, separe los tejidos que están debajo de la piel hasta que aparezca el músculo. Coloque hemostatos sobre venas y vénulas sangrantes.
 4. Con el bisturí corte a través del músculo y periostio
 5. Con el periostótomo separe el periostio de la costilla.
 6. Separe la costilla del cartílago, forzando esto a mano. Al otro extremo, corte la costilla.
 7. Levante el peritoneo con los fórceps y corte un pequeño agujero con la tijera. Introduzca la tijera con las hojas entreabiertas (el peritoneo entre ellas) y deslice las tijeras hacia arriba y luego hacia abajo, cortando así el peritoneo con mínima sangría.
 8. Localice el duodeno. Este se encuentra por la vesícula biliar.
 9. Pase un hemostato a través del omento para fijar el duodeno sobre la herida
 10. Con el bisturí haga una pequeña incisión en el duodeno, entre dos hileras paralelas de pequeños vasos sanguíneos. Con las tijeras asegúrese que el agujero está abierto. El diámetro del agujero debe ser como el de su dedo índice. Evite que el contenido del duodeno se derrame. Limpie cuando sea necesario. Alguien debe sujetar el extremo caudal del duodeno para evitar alguna oleada de contenido duodenal.
 11. La cánula duodenal se prepara introduciendo una de las pestañas de la cánula hacia el tubo de salida. Así preparado, introduzca la otra pestaña visible en la abertura del duodeno, en dirección al piloro. Un asistente

luego debe sostener esa pestaña en su lugar mientras que con un fórceps largo el cirujano empuja la pestaña escondida en el tubo hasta que ésta se extienda en su posición normal dentro del duodeno.

12. Con una sutura de seda SH tamaño 0, haga una sutura tipo "cordones de bolsa" (Fig. 8) alrededor de la base del tubo de salida de la cánula. Haga un nudo común. Manteniendo firme la costura y el nudo, empuje el borde del duodeno, de tal manera que éste quede con doblez hacia abajo. Luego termine de amarrar con firmeza.
13. El tubo de la cánula debe llenarse con gasa para prevenir el derrame de contenido duodenal a la cavidad abdominal.
14. Empuje la cánula y duodeno a su posición normal en el cuerpo. (Es bastante ventral).
15. Con un perforador de tapones (tamaño 12 u 11-esto hay que comprobarlo), corte un círculo en la piel entre la 10a. y 11a. costilla, un poquito antes que ellas terminen (en sus correspondientes cartílagos) pero aún, obviamente, en el costado del animal.
16. Retire el pedazo circular de piel y luego con un punzón especial, en forma de T, penetre hasta la cavidad abdominal.
17. Coloque el cono metálico especial en el tubo de la cánula y fíjelo.
18. Conecte el cono metálico (tiene un cable que sale de su punta) con la terminal del punzón. Luego hale el punzón hasta que el cono se exteriorice y con él, el tubo de la cánula.
19. Coloque una arandela de plástico (igual material que la cánula) sobre el

tubo y contra la piel. Luego envuelva el tubo varias veces con una cinta adhesiva hasta formar un obstáculo para el deslizamiento del tubo hacia la cavidad abdominal.

20. Ahora, cosa el periostio con puntadas continuas pero con entrelazados ("loop-over suturing"). Coja el peritoneo en este proceso. Esto es muy importante. Use seda No.2.
21. Cosa el lado externo del periostio incluyendo el músculo y la fascia. Así, se ha formado un tubo de periostio dentro del cual el bovino regenerará su 12a costilla en el término de 10 días.
22. Suture la piel con puntos interrumpidos
23. Limpie y rocíe con solución de yodo o Topazol
24. Coloque un tapón de hule en el tubo de salida de la cánula

DETERMINACION DE LA DIGESTION RUMINAL IN SITU UTILIZANDO LA TECNICA
DE LA BOLSA DE DACRON

Danilo Pezo, M. S.

A. REFERENCIAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

MEHREZ, A. Z. y ØRSKOV, E. R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. Journal of Agricultural Science 88:645-650. 1977.

SAN MARTIN, F. Digestibilidad, tasas de digestión y consumo de forraje, en función de la suplementación con banano verde. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR/CATIE, 1980. 59 p.

B. CONFECCION Y MANEJO DE LAS BOLSAS

1. Para la confección de las bolsas se utiliza tela de dacrón^{1/} con 1269 hoyos por centímetro cuadrado. Las dimensiones externas de las bolsas son 17 x 9 cm y las internas de 15.5 x 8.7 cm. Las bolsas deben ser cosidas con doble costura de hilo de nylon, evitando la formación de ángulos en las esquinas.

2. Una vez confeccionadas las bolsas, éstas deberán ser lavadas, secadas en un horno a 105°C por 8 horas. Luego de ser enfriadas en un desecador, pesarlas e identificarlas.

C. FABRICACION DEL SOPORTE MULTIPLE PARA BOLSAS

1. Corte tubería de cloruro de polivinilo (PVC) de 1/2 pulgada en 2 trozos

^{1/}Marvelaire, Beaconway Fabric and Yarn Center, Bangor, Maine, U.S.A.

de 10 cm y 2 de 27 cm de largo. Igualmente, con
de 3/8 pulgadas en pedazos de 10 y 27 cm de larg

2. Introduzca las barras de hierro dentro de los tubos
vinilo y únalas mediante codos de PVC. Péguelos
to adecuado para PVC. El soporte múltiple debe t
de un kilo.

D. DETERMINACION DE LA DIGESTION IN SITU

1. Pese aproximadamente 5 g de muestra seca molida (que
quela en una bolsa de dacrón. Sellar las bolsas
del hilo de nylon. En el extremo superior de la
de nylon de 2 mm de diámetro y 25 cm de largo, c
bolsas al soporte múltiple. Todas las determin
por duplicado.
2. Una vez atadas las bolsas de dacrón al soporte mú
al rumen de un animal fistulado, colocándolas en
3. Al concluir el tiempo de digestión (el cual será
acuerdo a la naturaleza del estudio), extraiga la
lávelas con agua potable, exprimiéndolas ligerame
tendrá al momento en que el agua de lavado no pre
4. Las bolsas lavadas se colocan en una estufa a 105
enfriar en desecador y luego se pesan.
5. Para estimar el ingreso de partículas del medio r
loque en dos bolsas con bolas de vidrio (canicas)
las cuales se introducen al rumen por un tiempo i
contienen muestras. Luego, proceda tal como se i
El cambio de peso de estas bolsas es representati
a la bolsa.

6. Para estimar la pérdida de muestra, pese 5 g de muestra seca molida (tamiz de 3 mm) y colóquela en una bolsa de dacrón. Introduzca la bolsa en un vaso de 500 ml de capacidad con 250 ml de agua destilada por 24 horas. La bolsa se agita cada hora en las primeras 6 horas y luego a intervalos de 6 horas. El agua es filtrada cada 6 horas a través de un papel de filtro Whatman No. 41 previamente tarado, restituyéndose el mismo volumen de agua destilada (250 ml) después de cada filtrado. Una vez realizado el último filtrado (al cabo de 24 horas), coloque el papel de filtro doblado en una luna de reloj e introdúzcalo en la estufa a 105°C por 8 horas. El cambio de peso del papel de filtro representa la pérdida de muestra.

Este procedimiento se realiza por triplicado.

7. Para la estimación de la digestibilidad se utiliza la siguiente fórmula:

$$DMS_c = 100 - \left[\frac{A - B}{C (1 - D)} \times 100 \right]$$

Donde:

DMS_c = digestibilidad de la materia seca corregida, por ciento

A = Materia seca indigerida, gramos

B = Materia seca ruminal adherida a las bolsas, gramos.

C = Materia seca inicial, gramos.

D = Pérdida de muestra, por ciento.

PROCEDIMIENTO PARA EL METODO DE DOS ETAPAS EN LA DETERMINACION

DE LA DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA ORGANICA DE LOS FORRAJES

Laboratorio de Nutrición Animal, Universidad de Florida, E.E.U.U.
Traducido por Gustavo Cubillos, Ph.D.

A. GENERAL

Este procedimiento es una adaptación de la técnica de Tilley y Terry de dos etapas y envuelve una fermentación por 48 horas por microorganismos del rumen seguida por una digestión con ácido clorhídrico y pepsina. Deben analizarse alicuotas separadas para el contenido de materia orgánica en la muestra y para la materia orgánica residual después de la fermentación-digestión. La cantidad de materia orgánica que desaparece se considera que ha sido digerida. Aproximadamente se pueden trabajar 200 muestras simultáneamente cuando se lleva a cabo sólo una determinación por muestra. Se recomienda hacer las determinaciones por duplicado.

B. REFERENCIAS

ALEXANDER, R. H. The establishment of a laboratory procedure for the in vitro determination of digestibility. Research Bulletin No. 42. The West of Scotland Agriculture College, Auchincruive, Ayr. 1969.

BRENES, R. F. Collaborative research with the two-stage in vitro technique. Proc. National Conference on Forage Evaluation and Utilization, Lincoln, Nebraska. 1969.

CUBILLOS, G. F., R. F. BARNES, C. M., NOLLER, D. CERVIÑO y F. ORTIZ. Efecto de la edad de la planta en la composición química y digestibilidad "in vitro" de la materia seca de Ballica perenne, (Lolium perenne L.) Agricultura Técnica (Chile) 30:1-6. 1970.

GOERING, H. K y P. J. VAN SOEST. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some application Agriculture Handbook No. 379, Agricultural Research Service, U. S. Department of Agriculture. 1970. 20 p.

MCLEOD, M. N. y MINSON, D. J. Sources of variation in the in vitro digestibility of tropical grasses. Journal of the British Grassland Society 24:244-249. 1969.

TILLEY, J. M. A. y TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. Journal of the British Grassland Society 18:104-111. 1963.

C. MATERIALES

1. Tubos de centrífuga, 100 ml, plásticos (Nalgene).
2. Tapones de goma para los tubos de centrífuga (tamaño 6), con un hoyo, y con una válvula Bunsen.
3. Portatubos de centrífuga. Bloques de madera pueden utilizarse a satisfacción.
4. Crisoles Gooch porcelana, coors 270, tamaño 3 (25ml).
5. Portacrisol para filtrado.
6. Crisoles corrientes, porcelana, coors 230, tamaño 1 (30 ml).
7. Botella Pyrex de 3.5 galones de modo que pueda ponerse en baño María.
8. Pipeta automática
9. Balón de CO₂ con una válvula de reducción y tubos para distribuir el CO₂. Este se distribuye a la botella de 3.5 galones y a los tubos de centrífuga.

10. Lana de vidrio Pyrex.
11. Además se requieren vasos de precipitación, termómetros, desecadores, probetas graduadas, paño de queso, pinzas, guantes de asbesto, botellas de lavado, etc.

D. EQUIPO

1. Baño María que acepte una botella de 3.5 galones.
2. Bureta automática, o un sistema como el mostrado en la Figura 13.
3. Estufa incubadora en que se puedan poner los tubos de centrífuga con las válvulas Bunsen. Puede usarse un baño María.
4. Agitador de tubos de ensayo, puede suprimirse y hacerse en forma manual.
5. Potenciómetro.
6. Fuente de agua caliente.
7. Reloj control para encender el baño María.
8. Horno de secado.
9. Mufia.

E. REACTIVOS

1. Saliva artificial McDougall (40 ml/tubo). Debido a que el fosfato de calcio insoluble precipita al pH de la solución tampón, la saliva debe prepararse en dos partes si es que se va a mantener almacenada por un tiempo.

a. Solución tampón (cantidades por litro, peso/volumen)

9.80 g	NaHCO_3
7.00 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3.71 g anhidro)
0.57 g	KCl
0.47 g	NaCl
0.12 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

b. Solución de cloruro de calcio al 4% (peso/volumen).

4.0 g CaCl_2 por 100 ml ó 5.3 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 100 ml

Justo antes de usar, agregue 1 ml de la solución CaCl_2 al 4% por litro de solución tampón de modo de tener 0.04 g CaCl_2 por litro de saliva artificial.

2. HCl al 20% (volumen/ volumen)

Diluya 200 ml de HCl concentrado hasta 1 litro (se requieren 6 ml por tubo).

3. Pepsina al 5% (peso/volumen). Agregue 5 g de pepsina a 100 ml de agua destilada (se requieren 2 ml por tubo).

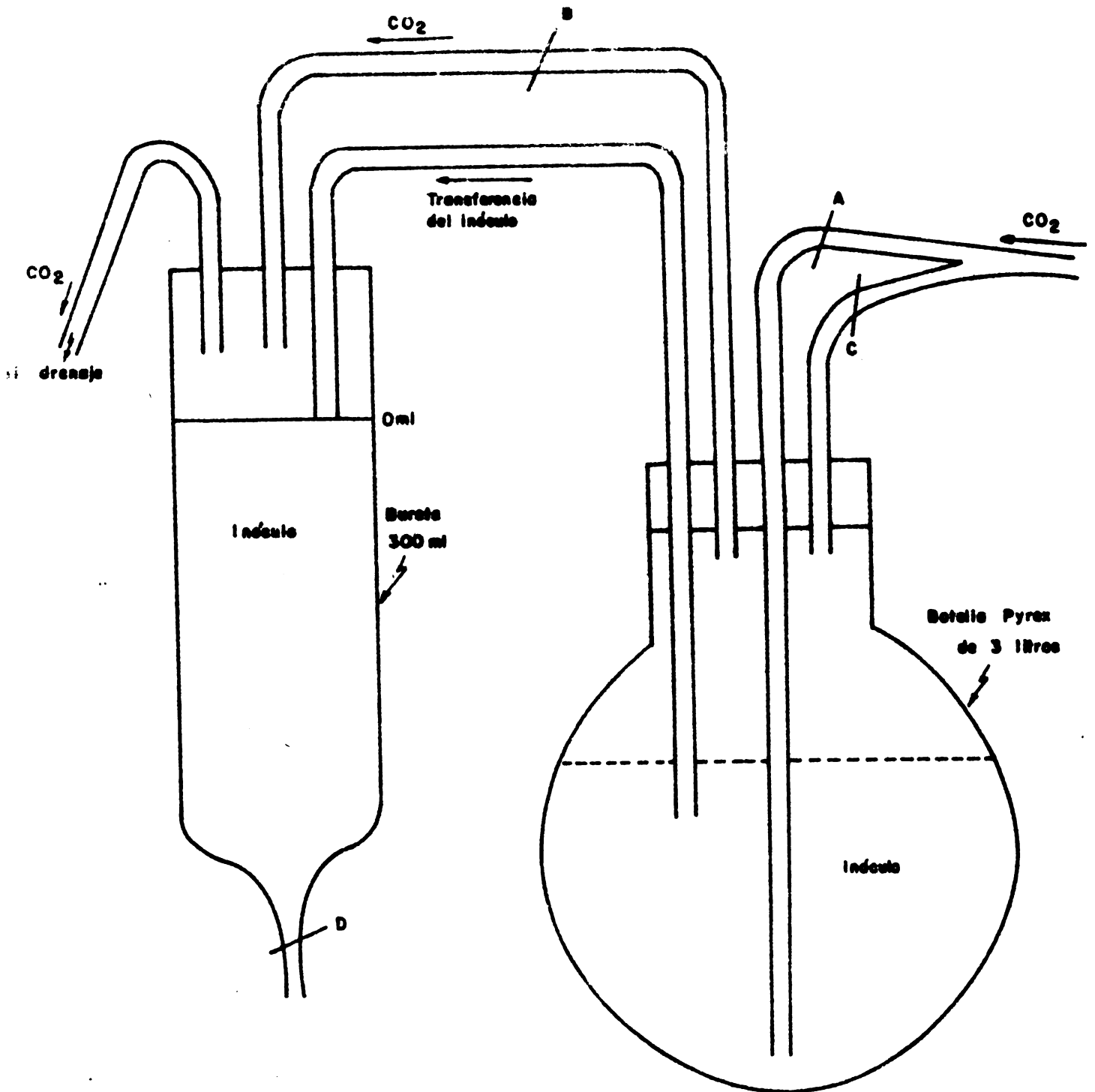
F. PREPARACION DE MUESTRAS

Las muestras de forrajes deben estar secas al aire (sobre 88% de materia seca, equilibradas con la humedad atmosférica por 48 horas a temperatura ambiente y molidas a través de un tamiz de 1 mm (Ej.: molino Wiley). Las muestras deben colocarse en envases adecuados de modo de facilitar la obtención de alicuotas. En climas muy húmedos las muestras deben almacenarse en un cuarto con humedad controlada.

G. INOCULANTE (LICOR RUMINAL)

1. Dieta del donante

Mantenga el animal fistulado en un heno de buena calidad, ej. heno de pasto Bermuda cuando las muestras son gramíneas.



LLAVES DE PASO :

- A - Ajustar para controlar tasa de paso del CO_2 a través del inóculo
- B - Cerrar para transferir inóculo a la bureta y abrir cuando la bureta está llena
- C - Abrir para aumentar presión para transferir el inóculo
- D - Abrir para poner inóculo en los tubos de fermentación

Fig. 13 Aparato para distribuir el inóculo

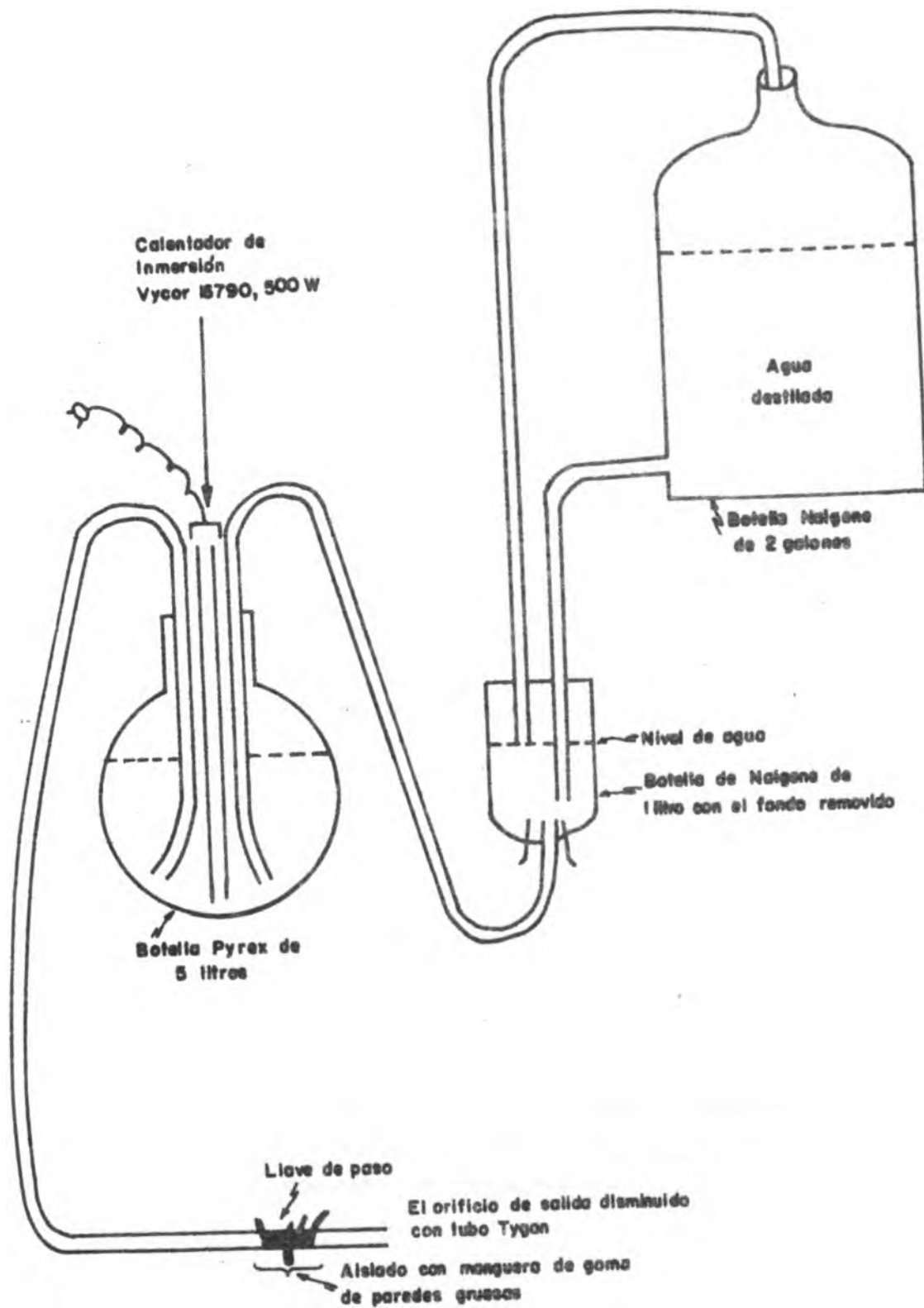


Fig. 14 Aparato para distribuir agua caliente

Proporcione el siguiente suplemento diariamente a un animal de 500 kg: 900 g de harina de soya (dividido en dos raciones de 450 g cada una), 75 g de sal mineralizada, 50 g de fosfato defluorinado y 20,000 UI de vitamina A.

2. PREPARACION (Se requieren 10 ml por tubo)

- a. Proporcione 450 g de harina de soya a las 8:00 a.m.; colecte el licor ruminal antes de las 10:00 a.m.; dele el heno después de tomar la muestra.
- b. Remueva el total del contenido de la parte superior del rumen y transfiera a un termo con una capacidad de 3 litros y que esté a 39°C.
- c. Lleve el contenido al laboratorio y filtre a través del paño de queso-ro, exprima bien el contenido gaseando con CO₂ el recipiente de recepción.
- d. Mida la cantidad de licor ruminal en un cilindro graduado previamente calentado y gaseado; transfiera a la botella que contiene la saliva artificial (vea H. 3. g.):

H. PROCEDIMIENTO

1. Peso de muestras de forraje

- a. Para las determinaciones de la materia seca-materia orgánica inicial: Coloque alrededor de 0.5 g de muestras en crisol seco, tarado y numerado, y pese la muestra hasta 4 decimales. (El análisis de materia seca no es esencial, pero este valor puede usarse en conexión con otros análisis).

- b. Para la digestión in vitro: coloque alrededor de 0.5 g de muestra, pesada con 4 decimales, en un tubo de centrifuga numerado.
2. Determinación de la materia seca y materia orgánica inicial:
 - a. Coloque los crisoles corrientes con su muestra en un horno de secado por 8-12 horas a 105°C.
 - b. Enfríe en un desecador y pese con 4 decimales.
 - c. Coloque los crisoles corrientes con las muestras en una mufla por 3 horas a 500°C.
 - d. Enfríe en un desecador y pese.
 3. Digestión in vitro
 - a. Tenga cuatro tubos de centrifuga vacíos para los blancos (sólo licor ruminal, no hay muestra de forraje).
 - b. Ponga el baño María y el incubador a 39°C.
 - c. Prepare la cantidad adecuada de solución tampón considerando que se usan 40 ml por tubo. Es conveniente preparar la primera parte de la solución con anticipación y guardar en el incubador a 39°C. La solución de 4% CaCl_2 se le agrega el día de la inoculación y toda la saliva se coloca en la botella de 3.5 galones en el baño María.
 - d. Haga circular CO_2 a través de la saliva en forma suave.
 - e. Añada 2 ml de agua destilada a todos los tubos de centrifuga, incluyendo los blancos con una pipeta automática. Moje todas las partículas de forraje.
 - f. Controle el pH de la saliva artificial; éste debe estar entre 6.9 y 7.0; el gaseo con CO_2 a través de la solución baja el pH y cuando la solución está saturada y el sistema tampón de bicarbonato está establecido, el pH será 6.9-7.0.
 - g. Prepare el inóculo como se describe en el inciso G.2 y añada una parte de licor ruminal a 4 partes de saliva artificial.

- h. Permita que el inóculo (licor ruminal y saliva) se mezclen por 10 minutos por acción del gaseo con CO_2 .
- i. Agregue 50 ml de inóculo a cada tubo de centrífuga, incluyendo blancos, use la bureta (agregue el inóculo al azar y los blancos deben distribuirse al azar entre el set de tubos).
- j. Inmediatamente después de agregar el inóculo, ponga los tubos en el baño María, gasee cada tubo por 15 segundos. No gasee CO_2 a través del inóculo en el tubo. Rápidamente tape los tubos con una válvula Bunsen.
- k. Transfiera los tubos a un incubador a 39°C (incluyendo blancos). Los tubos pueden permanecer en el baño María durante todo el período si así se desea.
- l. Después de una hora de incubación, mueva el contenido de los tubos a mano, con un movimiento rotatorio; de esta manera se asegura que todas las partículas están mojadas con el inóculo. Repita la operación dos veces el primer día y tres veces el segundo día.
- m. Después de 48 horas de incubación, remueva los tapones y lave las partículas adheridas a los tapones con un mínimo de H_2O destilada. Controle el pH de algunos tubos al azar, debe ser menos de 7.
- n. Agregue 1 ml HCl al 20%, mueva los tubos, agregue otro 1 ml 20% HCl, mueva y luego agregue 4 ml de 20% HCl (total de HCl = 6 ml/tubo); el pH del medio debe ser de 1-2 (para evitar exceso de espuma, espere a que todos los tubos hayan recibido todo el ácido antes de moverlos). moverlos).
- o. Añada 2 ml de pepsina al 5%, mueva los tubos, ponga los tapones y devuelva los tubos al incubador o al baño María a 39°C . Repita el movimiento de los tubos dos veces el primer día y tres veces el segundo.

- p. Prepare los crisoles Gooch poniendo unas 3 ó 4 capas de lana de vidrio. Si va a filtrar en papel filtro para determinar materia seca digestible, prepare sus papeles filtro, tarando cada uno después de ser secados a 100°C por 8 horas.
- q. Después de 46-48 horas de digestión con pepsina, transfiera el contenido de los tubos a los crisoles Gooch usando un soporte de crisoles. Use bajo vacío y el proceso de filtrado será rápido. Lave todo el residuo en el crisol y 3 veces con agua destilada. En caso de filtrar en papel filtro siga el mismo procedimiento asegurándose que todos los restos de forraje quedan en el papel.
- r. Ponga los crisoles Gooch en un horno a 105°C y seque a peso constante, enfríe en un desecador y pese. En caso de usar papel filtro haga el mismo proceso.
- s. Ponga los crisoles en una mufla a 500°C por 3 horas, enfríe en un desecador y pese.

I. CALCULOS

1. Anotar los siguientes pesos:

a. Para materia seca y materia orgánica

- Peso crisol (tara 1)
- Peso crisol + muestra (2)
- Peso crisol + muestra seca (3)
- Peso crisol + muestra incinerada (4)

b. Para digestibilidad de materia seca y materia orgánica

- Peso muestra en tubo de digestibilidad (+ 0.5 g) (5)
- *-Peso crisol Gooch o papel filtro (Whatman No. 54) seco (tara) (6)
- *-Peso crisol Gooch o papel filtro + residuo no digerido seco (7)
- *-Peso crisol Gooch incinerado (8)

* Se deben tomar estos mismos datos para los "blancos".

2. Cálculo del contenido de materia seca y orgánica en muestra.

$$1. \% \text{ Materia seca en muestra} = \frac{[3] - [1]}{[2] - [1]} \times 100$$

$$2. \% \text{ Materia orgánica en muestra} = \frac{[3] - [4]}{[3] - [1]} \times 100$$

(sobre base seca)

3. Cálculo de la digestibilidad de materia seca*

$$\% \text{ DMS} = 1 - \frac{([7] - [6]) - ([7b] - [6b])}{[5] \times \% \text{ MS}} \times 100$$

4. Cálculo de la digestibilidad de materia orgánica*

$$\% \text{ DMS} = 1 - \frac{([8] - [7]) - ([8b] - [7b])}{[5] \times \% \text{ MO}}$$

* El término "b" indica los datos correspondientes a los "blancos".

J. RESUMEN

Un ensayo de digestión puede comenzarse cada semana traslapando guientes etapas. Se sugieren los días de la semana en que debie lizarse cada etapa.

1. Digestión in vitro

- a. Pesar muestras en tubos (mie, jue, vie)
- b. Preparar saliva (vie)
- c. Inocular (lun, completar antes de las 10:00 a.m.)
- d. Acidificar y agregar pepsina (mie)
- e. Preparar crisoles Gooch con lana de vidrio (jue, p.m.).
papel filtro (mie y jue).
- f. Filtrado en crisoles Gooch o en papel filtro en horno se
- g. Colocar crisoles Gooch o papel filtro en horno secador (
- h. Transferir crisoles Gooch o papeles filtro del horno al
(lun, a.m.).
- i. Pesar crisoles Gooch e incinerar (lun, p.m.). Pesar pa
tro (lun, p.m.).
- j. Transferir crisoles Gooch de la mufla al desecador (mar,
- k. Pesar crisoles Gooch incinerados (mar, mie)
- l. Calcular % DIVMS ó % DIVMO

2. Materia seca-materia orgánica inicial

- a. Pesar muestras en crisol corriente y colocar en horno se
jue, vie, al mismo tiempo que J.1.a)

Las etapas siguientes deben completarse antes del próximo jueves:

- b. Transferir los crisoles corrientes del horno al desecador.
- c. Pesar los crisoles corrientes y colocar en la mufla.
- d. Transferir crisoles incinerados de la mufla al desecador.
- e. Pesar crisoles incinerados.
- f. Calcular % MS, % MO_{MS} y % MO_{cr} .

DETERMINACIÓN DEL GLICOL POLIETILENO (PEG) 4000

EN LA SANGRE Y OTROS FLUIDOS

A. Referencias sobre el procedimiento

MALAWER, S. J. y POWELL, D. W. Turbidimetric analysis of polyethylene glycol utilizing an emulsifier. *Gastroenterology* 53:250-256. 1967.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153:375-380. 1944.

Nota: El procedimiento que sigue es una adaptación del método de Malawer et al. (1967) para la determinación del glicol polietileno. Las modificaciones fueron hechas y comprobadas, en cuanto a su aplicabilidad, por el Dr. Edgar Weigand, ahora miembro del Animal Science Department del Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A.

B. Reactivos y su preparación

1. Estándares de PEG: prepare soluciones estándares de glicol polietileno 4000 a concentraciones entre 150 y 500 mg/100 ml. La curva sobre este rango de concentraciones de PEG es lineal. Si se desean almacenar los estándares es recomendable mantener las soluciones en la oscuridad y congelados. El glicol polietileno 4000 tiene un peso molecular entre 3000 y 3700.
2. Solución de Ba Cl₂: solución al 1% (p/v) de Ba Cl₂ anhidro, ó solución al 1.2% (p/v) de Ba Cl₂.2H₂O (99%).
3. Hidróxido de bario: prepare una solución Ba (OH)₂ 0.3N

4. Sulfato de zinc: Prepare una solución al 5% (p/v) de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Nota: Tanto la solución de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ como la de ZnSO_4 se preparan y titulan como lo describe Nelson (1944).

5. Solución de goma arábiga: Prepare una solución nueva de goma arábiga cada día. (Goma arábiga, USP powder, MC & B).
6. Reactivo de TCA: Prepare una solución al 30% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) conteniendo 5% (p/v) de BaCl_2 anhidro. El reactivo TCA luego debe filtrarse a través de vidrio finamente molido o en su defecto debe dejarse en reposo hasta que se clarifique para después ser vertida sin disturbar el precipitado.

C. Preparación de los filtrados libres de proteína

1. Transfiera 1 volumen de muestra (H_2O destilada, estándares de PEG, sangre, etc) a un frasco apropiado.
2. Añada 5 volúmenes de la solución de 1% BaCl_2 y mezcle
3. Añada 2 volúmenes de la solución de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0.3N y mezcle
4. Añada 2 volúmenes de la solución de 5% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y mezcle vigorosamente.
5. Centrifugue las muestras a unas 2000 g durante 15 minutos
6. Filtre los sobrenadantes a través de un papel de filtro Whatman No.42
7. Guarde los filtrados en la obscuridad si es que no se van analizar el mismo día.

Nota:

Se han probado otros métodos adecuados para preparar filtrados libre de proteínas, aunque con algunas limitaciones:

1. Acido sulfosalicílico al 20% (p/v): se añade en igual volumen que la muestra (estándar PEG para sangre). Cuando se requiere concentrar el filtrado, éste reactivo interferirá con la determinación del PEG.
2. Procedimiento de Folin y Wu (J. Biological Chemistry 38:81. 1919). Los iones de sulfato en el filtrado interfieren con la determinación del PEG.

D. Determinación del PEG

En duplicados:

1. Transfiera 1.0 ml de alícuota del filtrado libre de proteína a tubos de ensayo 10 x 150 mm.*
2. Añada 3.0 ml de la solución de goma arábiga (2.0 mg por litro) y mezcle agitando lentamente.*

* Este método permite la determinación del PEG en un rango de concentración de 150 a 500 mg % solamente. Para aplicar esta determinación a concentraciones bajas (hasta 50 mg %) del PEG, los pasos D.1 y D.2 se modifican de la siguiente manera:

- a. Para los estándares PEG:
 - D.2 Añada 2.0 ml de la solución 1% Ba Cl₂, seguidamente 1.0 ml de la solución de goma arábiga (6.0 mg por litro).
- b. Para muestras desconocidas, con concentraciones de PEG entre 50 y 150 mg%:
 - D.1 Transfiera 3.0 ml de alícuota del filtrado libre de proteína a los tubos de ensayo.
 - D.2 Añada 1.0 ml de la solución de goma arábiga (6.0 mg por litro).

3. Añada 4.0 ml del reactivo con 30% TCA a los tubos en forma secuencial.**
4. Tape los tubos con una película de parafina ("para-film") y mezcle inmediatamente invirtiendo los tubos cinco veces.
5. Deje en reposo las mezclas reactantes durante 90 minutos.
6. Lea las densidades ópticas (D.O.) de las muestras, en contraste con los "blancos" en cuvetas estándares de 4 ml - 10 mm a una longitud de onda 650 mμ y una abertura de rendija de 0.04 mm en el espectrofotómetro.
7. Grafique una curva estándar (D.O. 650 de los estándares PEG, corregida por el "blanco" PEG, versus la concentración del PEG).
8. Lea la concentración de PEG de las muestras desconocidas (con la D.O. 650 corregida por los blancos de las muestras), directamente del rango lineal de la curva estándar.

** Una secuencia para la adición del reactivo TCA es la siguiente: adición a cada grupo de cuatro tubos de ensayo cada tres minutos.

DETERMINACION DEL CANTIDAD POLIETILENO (PEG)
EN CONTENIDO ADOMASAL E INTESTINAL

A. REFERENCIAS

1. HYDEN, S. Kungl. LantbrHojsk. Ann. 22:139, 1956
2. SMITH, R.H. Substances in the calf alimentary tract interfering in the determination of polyethylene glycol. Nature 182:260-261. 1958.
3. SOMOGYI, M. Determination of blood sugar. Journal of Biological Chemistry 160:69-73. 1945.

B. Reactivos

1. PEG (peso molecular promedio:4000)
 2. $Ba(OH)_2$ 0.3N
 3. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ al 5% (p/v)
 4. Acetato de plomo al 6.6% (7.7 g de $Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3H_2O$ en un frasco volumétrico de 100 ml. Llene hasta la marca con agua deionizada).
 5. Cloruro de mercurio al 2.7% (p/v)
 6. Hidróxido de amonio 5 N (una parte de NH_4OH con dos partes de agua deionizada).
 7. Acido tricloroacético (TCA) al 30% (p/v) conteniendo 5% de $BaCl_2$ (p/v). Filtre esta solución a través de un papel de filtro Whatman No.42.
- } estandarizados entre si de
} acuerdo a Somogyi (1945)

C. Preparación de las soluciones estándares

1. Prepare 100 ml de solución de PEG del envase original a una concentración de 1 mg/ml
2. Use la solución base del PEG para preparar 100 ml de cada una de las siguientes concentraciones estándares:

1 mg/100 ml
5 mg/100 ml
10 mg/100 ml
15 mg/100 ml
20 mg/100 ml

El PEG en presencia de la luz es inestable, de tal modo que los estándares deben guardarse en la oscuridad y nunca por más de una semana.

D. Preparación de la muestra

1. Pese 4 g de muestra y colóquela en tubos graduados de centrifuga
2. Diluya a 48 ml con agua deionizada. Mezcle bien.
3. Deje que se equilibre en una refrigeradora durante 1 hora
4. Centrifugue por 20 minutos a 600 gravedades
5. Decante en tubos de polietileno de centrifuga
6. Centrifugue por 20 minutos (16.000 gravedades). El sobrenadante debe estar clarificado.

7. Pipetée 12 ml del sobrenadante y coloque en un tubo de ensayo
8. Añada 9 ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0.3 N. Deje que repose por 5 minutos
9. Añada lentamente 4.5 ml de acetato de plomo al 6.6%
10. Añada 4.5 ml de ZnSO_4 al 5% (p/v). Deje en reposo durante 5 minutos
11. Filtre a través de un papel de filtro acanalado Whatman No.12
12. Pipetée 10 ml del filtrado en un tubo de ensayo
13. Añada 3 ml de agua deionizada.
14. Añada 3 ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0.3 N
15. Añada, por goteo, y agitación continua, 4 ml de cloruro de mercurio (2.7% p/v) para lograr un pH final de 9-10.5. (La concentración de cloruro de mercurio puede modificarse ligeramente dependiendo de los otros reactivos y de la acidez de la muestra.
16. Filtre a través de un papel de filtro acanalado Whatman No.12
17. Añada 1 gota de NH_4OH 5 N
18. Filtre a través de un papel de filtro acanalado Whatman No.12

E. Determinación de la concentración de PEG

1. Coloque en un frasco Erlenmeyer de 25 ml:
 - 5 ml de muestra (use duplicados)
 - ó estándar (use duplicados)
 - ó agua deionizada como "blanco" (duplicados tanto al principio como al final).
2. A intervalos de 1 minuto añada, por una sola vez, 1 ml TCA (30% p/v) con BaCl_2 (5% p/v) y agite vigorosamente. (Se recomienda el uso de una pipeta automática para esta adición).
3. Exactamente 5 minutos después de cada adición de TCA lea cada muestra en un colorímetro usando un filtro No. 42.
4. Calcule las concentraciones sobre la base de una curva estándar.

DETERMINACION DEL N TOTAL EN ORINA

A. REFERENCIA

Método empleado en el laboratorio del grupo de Ciencia Lechera, en el Animal Science Department, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A.

B. PROCEDIMIENTO

1. Diluya unos 10 g de orina en un frasco volumétrico de 100 ml (10 g de orina en un frasco de 50 ml en el caso de orina de ternero).
2. Pese con precisión tanto la orina como el frasco.
3. Prepare muestras por duplicado para digestión en micro Kjeldahl, de la siguiente manera:
 - a. 4 ml de orina diluída (5 en el caso de la orina de ternero).
 - b. 2 g de catalizador (10 partes de K_2SO_4 con 1 parte de $CuSO_4$).
 - c. 2 ml de H_2SO_4 concentrado.
4. Caliente hasta 10 minutos después que la digesta se haya clarificado.
5. Retire la muestra del digestor y permita que se enfríe parcialmente.
6. Añada alrededor de 20 ml de agua antes que se solidifique la digesta.

7. Destile el vapor:
 - a. Vacíe la muestra en el aparato de destilación.
 - b. Enjuague el frasco Kjeldahl dos veces con 5-10 ml de agua.
 - c. Añada 10 ml. de NaOH al 50% (p/v), luego enjuague el embudo con 5 ml de agua.
 - d. Destile 15 ml los que deben recibirse en 35 ml de ácido bórico al 2%, conteniendo 3 gotas de un indicador mixto*.
 - e. Titule con H_2SO_4 0.01N.

* Indicador mixto: 225 mg de rojo metilo, 83 mg de azul de metileno y 100 ml de etanol (95%).

DETERMINACION DEL N TOTAL EN JUGO RUMINAL

A. REFERENCIA

Método usado en el laboratorio del Grupo de Ciencias del Lechería del Animal Science Department, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A.

B. Procedimiento

1. Diluya en agua destilada 10 ml licor ruminal en un frasco volumétrico de 50 ml.
2. Prepare muestras en duplicado para digestión en microkjeldahl:
 - a. 5 ml de licor ruminal diluido
 - b. 2 ml de catalizador*
 - c. 3 ml de H_2SO_4 concentrado
3. Caliente hasta 10 minutos después que la muestra en digestión se haya clarificado.
4. Retire el frasco del calentador y deje que enfríe parcialmente
5. Añada 15-20 ml de agua antes que ocurra solidificación
6. Destile con vapor:
 - a. Vierta la muestra en el aparato de destilación
 - b. Enjuague el frasco Kjeldahl dos veces con 5-10 ml de agua
 - c. Añada 12 ml de NaOH al 50% (p/v), luego use unos 5 ml de agua para enjuagar el embudo.
 - d. Destile 15 ml y colecte en 35 ml de ácido bórico al 2% conteniendo tres gotas de un indicador mixto*.
 - e. Titule con H_2SO_4 0.01 N

*Vea procedimiento para su preparación en "Determinación de N total en orina".

DETERMINACION DEL N TOTAL EN JUGO RUMINAL CENTRIFUGADO (JRC)

A. REFERENCIA

Método empleado en el laboratorio del grupo de Ciencias de Lechería del Animal Science Department, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A.

B. PROCEDIMIENTO

1. Deje en reposo la muestra de contenido ruminal en un refrigerador durante varias horas. El material más pesado se depositará en el fondo del tubo.
2. Vacíe el líquido superior (no agite o disturbe el material depositado en el fondo). Centrifugue unos 15 ml del líquido superior en una centrífuga de alta velocidad a una marca de velocidad de "60", durante 30 minutos.
3. Prepare muestras en duplicado para digerirlas en micro Kjeldahl:
 - a. 2 ml de JRC
 - b. 2 g de catalizador
 - c. 3 ml de H_2SO_4 concentrado
4. Digiéra y destile según se describe en el procedimiento para "Determinación del N total en jugo ruminal".

DETERMINACION DEL NITROGENO NO PROTEICO (NNP) EN JUGO RUMINAL

A. REFERENCIA

Método usado en el laboratorio del Grupo de Ciencias de Lechería del Animal Science Department, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A.

B. PROCEDIMIENTO

1. Prepare un precipitado del jugo ruminal usando TCA para determinar el NNP:
 - a. 10 ml de jugo ruminal
 - b. 40 ml de TCA (ácido tricloroacético) al 16%
 - c. Centrifugue en una centrífuga de alta velocidad a una regulación de "60", durante 30 minutos.

2. Prepare muestras en triplicado para digestión micro-Kjeldahl:
 - a. 10 ml de jugo ruminal desproteínizado (el líquido que queda en los tubos de centrifugación).
 - b. 2 g de catalizador (10 partes de K_2SO_4 con 1 parte de $CuSO_4$).
 - c. 3 ml de H_2SO_4 concentrado.

3. Caliente hasta 10 minutos después que el material en digestión se haya clarificado.

4. Retire el frasco del digestor, deje que enfríe parcialmente.

5. Añada alrededor de 20 ml de agua antes que ocurra la solidificación.
6. Destile el material digerido con vapor:
 - a. Transfiera la muestra al aparato de destilación
 - b. Enjuague el frasco Kjeldahl dos veces con 5-10 ml de agua
 - c. Añada 12 ml de NaOH al 50%, luego use unos 5 ml de agua para enjuagar el embudo.
 - d. Destile 15 ml recibiendo en 35 ml de ácido bórico al 2% (p/v) conteniendo 3 gotas de un indicador mixto.
 - e. Titule con H_2SO_4 0.01N.

DETERMINACION DE PROTEINA (METODO DE LA TIROSINA)

A. REFERENCIA

LOWRY, D. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193:265-275. 1951.

B. REACTIVOS

1. 2% Na_2CO_3 en NaOH 0.1 N
2. 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1% tartrato de sodio o de potasio.
3. 50 ml del reactivo 1 con 1 ml del reactivo 2. Bótelo después de 1 día de hecho.
4. Estandard proteínico: 0.5 mg de caseína por ml; debe prepararse cada vez que se use el método.
5. Reactivo fenol Folin - Ciocalteau.

C. PROCEDIMIENTO

1. Diluya la muestra de tal modo que contenga entre 25 y 500 mg de proteína por ml. Si la muestra contiene sulfato de amonio hay que diluirla con Na_2CO_3 al 10% (si la concentración de sulfato de amonio es mayor que 0.25% después de haber añadido todos los reactivos, las lecturas serán muy bajas).

2. Coloque 1 ml de la muestra diluída y 5 ml del reactivo 3 en un tubo de ensayo.
3. Mezcle y deje en reposo durante 10 minutos o más a temperatura ambiental.
4. Añada rápidamente y mezcle (en un tiempo de 1 a 2 segundos) 0.5 ml del reactivo 5 y lea, después de 30 minutos, a una longitud de onda de 750 m μ usando un "blanco" de reactivos (use agua en vez de proteína) para calibrar el instrumento.
5. Obtenga una curva estándar con 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ml del estándar de caseína, añadiendo suficiente agua a cada tubo para llevar el volúmen hasta la marca de 1 ml.



DETERMINACION DE PROTEINA (METODO DEL BIURET)

A. REFERENCIA

Methods in Enzymology (S.P. Colowick y N. O. Kaplan, eds)., Academic Press, New York. Vol. 3, p. 447. 1957.

B. REACTIVO BIURET

1. Disuelva 1.5 g de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 6.0 g de tartrato de sodio potásico ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en unos 500 ml de agua.
2. Añada, con agitación constante, 300 ml de NaOH al 10% (preparado directamente del envase original de una solución 65 a 75% NaOH, libre de carbonatos, o preparado a partir de 30 g de NaOH grado reactivo).
3. Diluya con agua hasta la marca de 1 litro y guarde en una botella de plástico. Elimine el reactivo si es que se forma cualquier precipitado negro o rojo (se recomienda la adición de 0.1 g KI, pues puede prevenir una reducción excesiva y no afecta al método).

C. PROCEDIMIENTO

1. Coloque 1.0 - 2.0 ml de solución, conteniendo 1.0 - 10.0 mg de proteína, en un tubo de ensayo limpio
2. Añada suficiente agua destilada para completar 2.0 ml
3. Añada 8.0 ml del reactivo biuret y deje en reposo durante 30 minutos

- a temperatura ambiental.
- a. Para muestras de tejido que pueden contener lípidos añada unos 4 ml de éter, después de añadir el reactivo biuret, y mezcle a conciencia.
 - b. Después de centrifugar las muestras que contienen éter (o después de un reposo de 30 minutos para que se separen las capas) quite la capa de éter mediante succión dejando la capa inferior incolora.
4. Treinta minutos o más después de añadir el reactivo biuret determine la densidad óptica a 540 m μ contra un "blanco" que consiste de 8 ml de reactivo biuret más 2 ml de agua o una solución salina apropiada .
 5. La concentración de protefna se determina por interpolación en una curva de calibración establecida con soluciones incoloras de proteínas séricas.

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO

LACTICO EN FLUIDO RUMINAL*

A. REFERENCIA

BARKER, S. B. y SUMMERSON, W. H. The calorimetric determination of lactic acid in biological material. Journal of Biological Chemistry 138:535. 1941.

B. PRECIPITACION DE LA PROTEINA EN LA MUESTRA

1. Pipetée 5.0 ml de muestra en un tubo de centrifugación de 35 ml.
2. Añada 1.0 ml de ácido metafosfórico al 25% (preparado fresco), arremoline y deje en reposo por 30 minutos.
3. Centrifugue durante 10 minutos a 10000 rpm en una Supercentrífuga Automática Servall.

C. TRATAMIENTO DEL SOBRENADANTE LIBRE DE PROTEINA CON COBRE Y CALCIO

1. Pipetée 1.0 ml de fluido sobrenadante (evite a todas costas la inclusión de material sólido presente en una película superficial) en un tubo de cultivo de 16 x 100 mm con tapa de rosca.
2. Añada 1.0 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 20% (p/v).
3. Añada 8.0 ml de agua deionizada.

4. Añada alrededor de 1 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en polvo, tape y agite vigorosamente (tal vez con el uso de un Ciclo-Mixer Adams). Deje en reposo por lo menos 30 minutos con mezclado ocasional.
5. Centrifugue durante 15 minutos en una centrífuga International con el reóstato fijo en 35.

D. DESARROLLO DEL COLOR

1. Coloque 6.0 ml de H_2SO_4 concentrado (gravedad específica 1.84) en un tubo de cultivo 25 x 150 mm con tapa de rosca forrada con teflón.
2. Añada 0.05 ml (1 gota) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 12% (p/v) y enfríe la mezcla en un baño de hielo.
3. Con el tubo aun en el baño de hielo, con mucho cuidado sobrecargue el ácido con 1.0 ml del sobrenadante cobre - calcio. Tape el tubo inmediatamente y agite (Cyclo-Mixer).
4. Coloque los tubos en un baño maría a 100°C durante 5 minutos, retírelos y enfríelos a temperatura menor que la ambiental.
5. Añada 0.1 ml (2 gotas) de una solución de para-fenil fenol (p-hidróxi-difenil) al 1.5% en NaOH al 0.5%.

* Según lo desarrollado por DeBarthe, estudiante graduado del Animal Science Department, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A.

6. Inmediatamente disperse en forma completa el precipitado entre el contenido del tubo con un Cyclo-Mixer.
7. Coloque los tubos en un baño María a 30°C durante 30 minutos a fin de que se desarrolle un color.
8. Luego, coloque los tubos en un baño María a 100°C durante 90 segundos para destruir el exceso de reactivo colorante y enfríe a temperatura debajo de la ambiental.
9. Determine la densidad óptica a 565 m μ en un espectrofotómetro Beckman Modelo B.

ALGUNAS DIRECCIONES Y DATOS UTILES PARA PREPARARSE

EN LA EJECUCION Y UTILIZACION DE FISTULAS

Manuel E. Ruiz, Ph.D.

A. Ethicon, Inc.

Somerville, New Jersey

U.S.A.

- Solicitar: 1. "Manual of Operative Procedure and Surgical Knots"
(copyright 1968).
2. Suture Use Manual

B. Ms. Loretta Flowers

Cannula Manager

Bar Diamond, Inc.

Route 2, Box 308

Parma, IDAHO 83660

U.S.A.

Tel. (208) 722-6556

Vende cánulas ruminales hechas de plastisol. La señorita hace y distribuye las cánulas y anillos. Una cánula NU4 para bovinos vale US\$6

C. Ms. Betty O'Brien

Beaconway Fabric Center

587 Broadway

Bangor, Maine 04401

U.S.A.

Tel. (207) 942-4232

Vende tela dacrón para hacer bolsas ruminales para estudios de digestibilidad in rumen.

Una yarda de tela dacrón Marvelite cuesta U.S.\$2.09.

D. Gentec Hospital Supply Co.

7455 N. E. 2nd. Ave.

Miami, Florida 33138

U.S.A.

Tel. (305) 445-7841

Tiene un surtido muy completo (y si algo no tiene lo consigue de otra firmas) de equipo quirúrgico y artículos de cirujano. Ejemplos de costos : un mango de bisturí (0623-1040), US\$3.40; un hemostato (8022-5129), US\$20.00; un par de tijeras (8022-5341), US\$15.30; etc. Por el caro de estos materiales es necesario mantener en un mínimo el pedidc

FUENTES BIBLIOGRAFICAS DE IMPORTANCIA
EN EL CAMPO DE CIRUGIA NUTRICIONAL Y
SU USO EN LA INVESTIGACION

1. ASH, R. W. Gastro-intestinal re-entrant cannulae for studies of digestion in sheep. *Animal Production* 4:309. 1962.
2. AUSTEN, P., H. L. BUTTLE, D. A. CORSE, A. T. COWIE, V. W. JOHNSON, J. D. OLDHAM, J. D. SUTTON y S. C. WATSON. The establishment of intestinal fistulas in dairy cows and maintenance of lactational performance. *Z. Tierphysiol., Tierernahrg. u. Futtermittelkde* 39:192. 1977.
3. BARNETT, A. J. G. y R. L. REID. Experimental methods and approaches. In: *Reactions in The Rumen*. London, Arnold. p. 34. 1961.
4. DRORI, D. y J. K. LOOSLI. Influence of fistulation on the digestibility of feeds by steers. *Journal of Animal Science* 18:206. 1959.
5. FAICHNEY, G. J. y G. A. WHITE. Formaldehyde treatment of concentrate diets for sheep. I. Partition of the digestion of organic matter and nitrogen between the stomach and intestines. *Australian Journal of Agricultural Research* 28:1055. 1977.
6. HARRIS, L. E. y A. T. PHILLIPSON. The measurement of the flow of food to the duodenum of sheep. *Animal Production* 4:97. 1962.
7. HAYES, B. W., C. O. LITTLE, y G. E. MITCHELL, JR. Influence of ruminal, abomasal and intestinal fistulation on digestion in steers. *Journal of Animal Science* 23:764. 1964.
8. HOGAN, J. P. y A. T. PHILLIPSON. The rate of flow of digesta and their removal along the digestive tract of sheep. *British Journal of Nutrition* 14:147. 1962.
9. HORNEY, F. D., R. A. LEADBEATER y T. S. NEUDOERFFER. Re-entrant cannulation and postoperative therapy in cattle. *American Journal of Veterinary Research* 33:1385. 1972.

10. HUNGATE, R. E. Ruminal functions related to rumen microbial activity. In: The Rumen and Its Microbes. New York, Academic Press. p. 148. 1966.
11. HVELPLUND, T., P. D. MOLLER, J. MADSEN y M. HESSELHOLT. Flow of digesta through the gastro-intestinal tract in the bovine with special reference to nitrogen. Royal Veterinary and Agricultural University (Denmark), Yearbook 1976:173. 1976.
12. KEMPTON, T. J. El uso de bolsas de nylon para caracterizar el potencial de degradabilidad de alimentos para el rumiante. Producción Animal Tropical 5:115. 1980. vja
13. LEIBHOLZ, J., G. W. WARD y G. J. L. JACOBS. The insertation of re-entrant cannulae in young calves and their maintenance for long periods. Australian Veterinary Journal 51:131. 1975.
14. MACRAE, J. C. The use of re-entrant cannulae to partition digestive function within the gastro-intestinal tract of ruminants. In: Digestion and Metabolism in the Ruminant. I. W. McDonald and A. C. I. Warner, eds. p. 261. 1975.
15. MACRAE, J. C. y M. J. ULYATT. Comparison of spot and continuous sampling for estimating duodenal digesta flow in sheep. New Zealand Journal of Agricultural Research 15:98. 1972.
16. MEHREZ, A. Z. y ØRSKOV, E. R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. Journal of Agricultural Science 88:645. 1977.
17. ØRSKOV, E. R. y HOVELL, F. D. DeB. Digestión ruminal del heno (medida a través de bolsas de dacrón) en el ganado alimentado con caña de azúcar o heno de pangola. Producción Animal Tropical 3:9. 1978.
18. PUTNAM, P. A. y R. E. DAVIS. Postruminal fiber digestibility. Journal of Animal Science 24:826. 1965.
19. ROWE, J. B. Homemade gastro-intestinal cannulae. Tropical Animal Production 4:127. 1979.
20. SAN MARTIN, F. A. Digestibilidad, tasas de digestión y consumo de forraje; en función de la suplementación con banano verde. Tesis Magister Scientiae, UCR-CATIE. Turrialba, Costa Rica. 59 p. 1980.