

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 INSTALACIONES Y UBICACIÓN DE LAS ZONAS MUESTREADAS

El presente estudio se llevo a cabo en un total de 44 hatos bovinos para realizar el diagnóstico de Neosporosis, de los cuales 41 fueron de bovinos destinados a la producción de leche y 3 de bovinos destinados a la producción de carne (Tabla 1). Hay que mencionar que de los 41 hatos de bovinos destinados a la producción de leche se utilizaron 29 para realizar de nuevo el diagnóstico de Neosporosis, así como el diagnóstico de Leucosis y Brucelosis (Tabla 2). Se muestrearon explotaciones ganaderas de distintas dimensiones que comprenden hatos pequeños, medianos y grandes con diversas características y condiciones.

El análisis serológico de las muestras se llevo a cabo en la Unidad de investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas y Genéticas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en la Facultad de Ciencias Biológicas en el Laboratorio de Biotecnología Unidad C. La distribución relativa de las zonas muestreadas se ubican en la figura 11 en los Estados de color blanco.

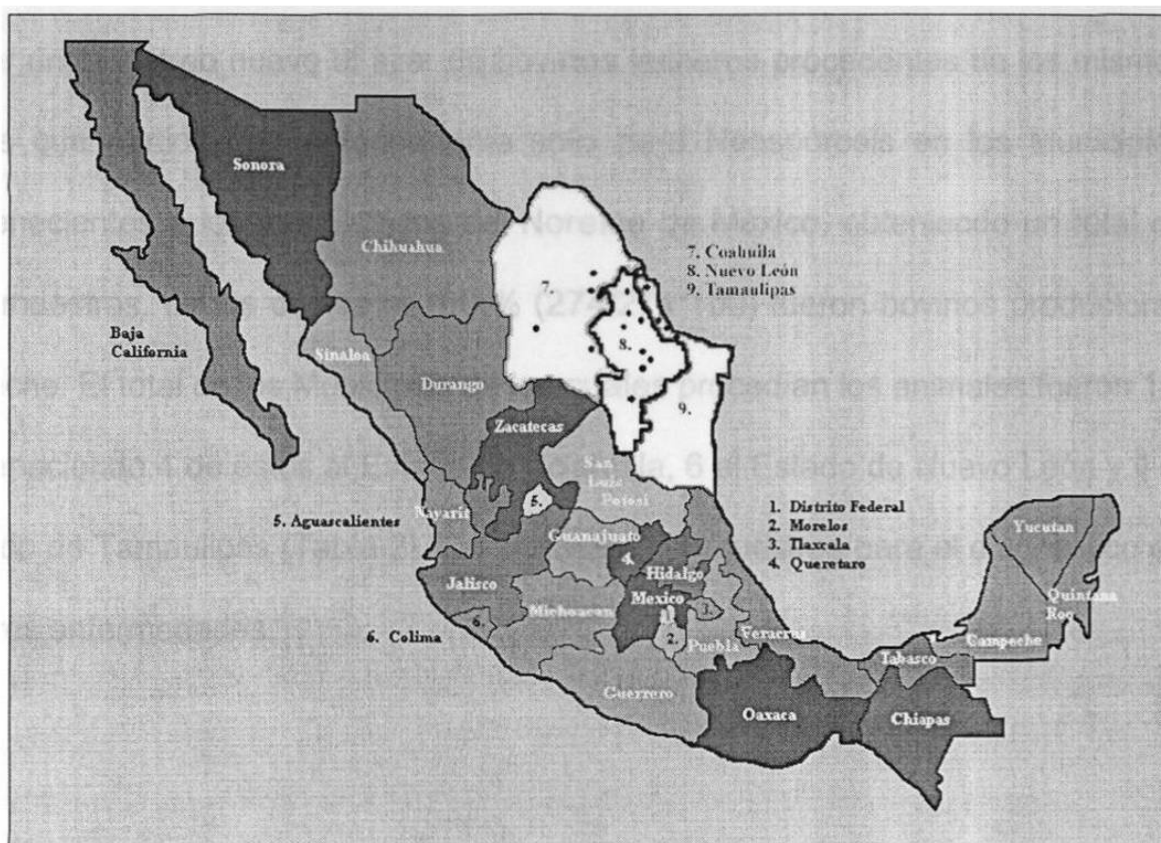


Figura 11. Distribución de las Zonas muestreadas.

2.2 TOTAL DE MUESTRAS, TIPO DE PRODUCCIÓN Y PROCEDENCIA

Para el estudio sobre Neosporosis se obtuvieron un total de 591 muestras, de las cuales el 90 % ($532/591 \cdot 100$) correspondió al ganado productor de leche y el 10 % ($59/591 \cdot 100$) correspondió al ganado productor de carne. El total de los Municipios de los cuales procedían los animales fueron 16, en donde 14 Municipios fueron para bovinos productores de leche y 2 Municipios (Linares y Pesquería) para bovinos productores de carne, perteneciendo 4 de éstos al

Estado de Coahuila, 8 al Estado de Nuevo León y 4 al Estado de Tamaulipas (Tabla 1). Posteriormente para Neosporosis, Leucosis y Brucelosis se procedió a hacer un muestreo nuevo al azar de bovinos lecheros procedentes de los mismos hatos que participaron anteriormente solo para Neosporosis en los Municipios pertenecientes a los tres Estados del Noreste de México, obteniendo un total de 274 muestras, de los cuales el 100 % ($274/274*100$) fueron bovinos productores de leche. El total de los Municipios de los cuales procedían los animales fueron 14, perteneciendo 4 de éstos al Estado de Coahuila, 6 al Estado de Nuevo León y 4 al Estado de Tamaulipas (Tabla 2). Las mismas 274 muestras para el diagnóstico de las tres enfermedades.

Tabla 1. Localización y tipo de producción de los hatos muestreados en el Noreste de México para el diagnóstico serológico de Neosporosis

Estado	Municipio	Muestras	Número de hatos analizados	Bovinos de carne	Bovinos lecheros	Total analizados por Municipio	Total analizados Por Estado
Coahuila	Candela	36	4	-	36	36	185
	Saltillo	16	1	-	16	16	
	San Buenaventura	38	5	-	38	38	
	Torreón	95	2	-	95	95	
Nuevo León	Anáhuac	18	2	-	18	18	262
	Linares	29	2	29	-	29	
	Marín	63	1	-	63	63	
	Paras	10	1	-	10	10	
	Pesquería	30	1	30	-	30	
	Sabinas	38	5	-	38	38	
	Vallecillo	64	8	-	64	64	
	Zuazua	10	1	-	10	10	
Tamaulipas	Díaz Ordaz	29	3	-	29	29	144
	Guerrero	36	1	-	36	36	
	Nuevo Laredo	37	2	-	37	37	
	Laredo						
	Río Bravo	42	5	-	42	42	
Gran Total	16	591	44	59-10%	532-90%	591	591

Tabla 2. Localización y tipo de producción de los hatos muestreados en el Noreste de México para detectar Neosporosis, Leucosis y Brucelosis en ganado lechero.

Estado	Municipio	Muestras	Número de hatos	Total analizados por Estado
Coahuila	Candela	8	2	54
	Saltillo	9	1	
	San Buenaventura	10	2	
	Torreón	27	2	
Nuevo León	Anáhuac	5	1	113
	Marín	63	1	
	Paras	10	1	
	Sabinas	20	5	
	Vallecillo	10	2	
	Zuazua	5	1	
Tamaulipas	Díaz Ordaz	29	3	107
	Guerrero	12	1	
	Nuevo Laredo	24	2	
	Laredo			
	Río Bravo	42	5	
Gran Total	14	274	29	274

2.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES

Para el caso de Neosporosis, de los 591 bovinos analizados, el 87 % ($515/591 \cdot 100$) fueron de la raza Holstein-Friesian, el 3 % ($17/591 \cdot 100$) fueron bovinos criollos cruce de Holstein con Brahman y el 10 % ($59/591 \cdot 100$) fueron bovinos de la raza Charolais (Tabla 3). Por otra parte para Neosporosis, Leucosis y Brucelosis de los 274 bovinos analizados, el 98 % ($268/274 \cdot 100$) fueron de la raza Holstein-Friesian y el 2 % ($6/274 \cdot 100$) fueron bovinos Criollos (Tabla 4) Todos los bovinos analizados fueron hembras.

Tabla 3. Raza, tipo de producción y cantidad de bovinos analizados para Neosporosis.

Raza	Función zootécnica	Número de bovinos	% de bovinos
Charolais	BpC	59	10
Criollo (Holstein-Brahman)	BpL	17	3
Holstein	BpL	515	87
Total	BpC y BpL	591	100

BpC = bovinos producción carne, BpL = bovino producción leche

Tabla 4. Raza, tipo de producción y cantidad de bovinos analizados para Neosporosis, Leucosis y Brucelosis

Raza	Función zootécnica	Número de bovinos	% de bovinos
Criollo (Holstein-Brahman)	BpL	6	2
Holstein	BpL	268	98
Total	BpL	274	100

2.4 TOMA DE MUESTRAS Y OBTENCIÓN DE SUERO

A partir de los bovinos se extrajo sangre venosa aproximadamente entre 3 y 5 ml a partir de la Vena Coccígea y en algunas ocasiones de la Vena Yugular empleando tubos al vacío (13 x 100) sin anticoagulante y agujas tipo "Vacutainer" calibre (21 x 1½). Para obtener el suero, la sangre, una vez extraída se dejó coagular a temperatura ambiente y se mantuvo en refrigeración hasta su arribo al laboratorio. Una vez coagulada la sangre, la muestra se centrifugó a 3,000 rpm x 15 minutos; extrayendo el suero mediante succión con pipetas Pasteur depositándose aproximadamente 2 ml en tubos para serología con capacidad de 3 ml. Previa identificación se almacenaron en congelación a -20°C hasta que se procedió a realizar las pruebas serológicas correspondientes. Todo el procedimiento descrito fue similar para ambos muestreos.

2.5 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Neospora caninum*.

2.5.1 ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA NEOSPOROSIS.

Para la determinación de anticuerpos contra Neosporosis en el suero del animal se utilizó el estuche de diagnóstico comercial llamado “HerdChek *Neospora caninum* Antibody Test Kit”, de Laboratorios IDEXX , el cual se basa en el método de ELISA (Apéndice A). Primero se llevo a cabo la preparación de la solución de lavado, diluyendo el concentrado para lavado a una razón de 1:10 con agua destilada/deionizada. Posteriormente cada muestra de suero se diluyó a una razón de 1:100 con el diluyente para muestra (tampones con estabilizadores proteicos con Azida de Sodio como conservante). Una vez teniendo la solución de lavado preparada y las muestras diluidas se procedió a realizar la prueba. Se obtuvieron las placas y se registraron en una hoja de trabajo HerdChek ; se colocaron 100µl de control negativo sin diluir en los pozos A1 Y A2 y 100µl de control positivo también sin dilución en los pozos A3 Y A4, después se agrego la muestra de suero diluida en cada pozo correspondiente de la placa y se incubo por 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar los 30 minutos se aspiró el líquido de todos los pozos desechándolo en un recipiente apropiado. Posteriormente se lavo cada pozo 4 veces con aproximadamente 300µl de solución de lavado tamponada con fosfato, aspirando el líquido de todos los pozos después de cada lavado desechándolos en recipientes apropiados y golpeando la placa suavemente al finalizar el lavado para transferir el líquido residual a un material absorbente.

Posteriormente fueron agregados 100 μ l de conjugado anti-bovino (HRPO) en cada pozo y se incubo 30 minutos a temperatura ambiente, se volvió a aspirar el líquido, desechándolo en un recipiente apropiado y se repitieron los 4 lavados con el mismo procedimiento. Después se agrego 100 μ l de solución de substrato TMB en cada pozo de la placa y se incubo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último al finalizar los 15 minutos se agrego 100 μ l de solución de interrupción (stop) en cada pozo de la placa para detener la reacción. Se midió y registró la absorbancia a 630nm en el Lector (figura 13) de cada muestra y se calcularon los resultados mediante la validación de un paquete computacional Xchek. Las lecturas se realizaron en doble muestra y también los resultados se calcularon en forma manual bajo la prueba de validación y de acuerdo al instructivo del estuche comercial de *Neospora caninum* (ver Apéndice A). En la figura 12 se muestra la seropositividad de algunas muestras contra *N. caninum*.

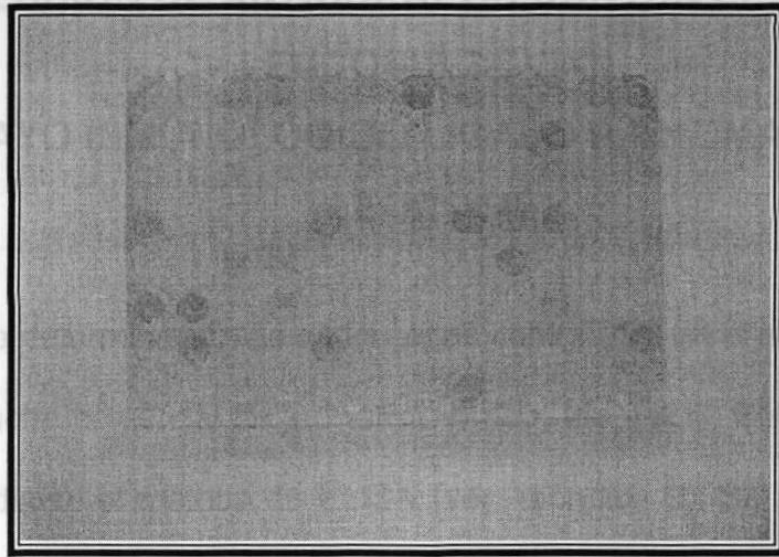


Figura 12. Placa mostrando seropositividad de algunas muestras contra *Neospora caninum*

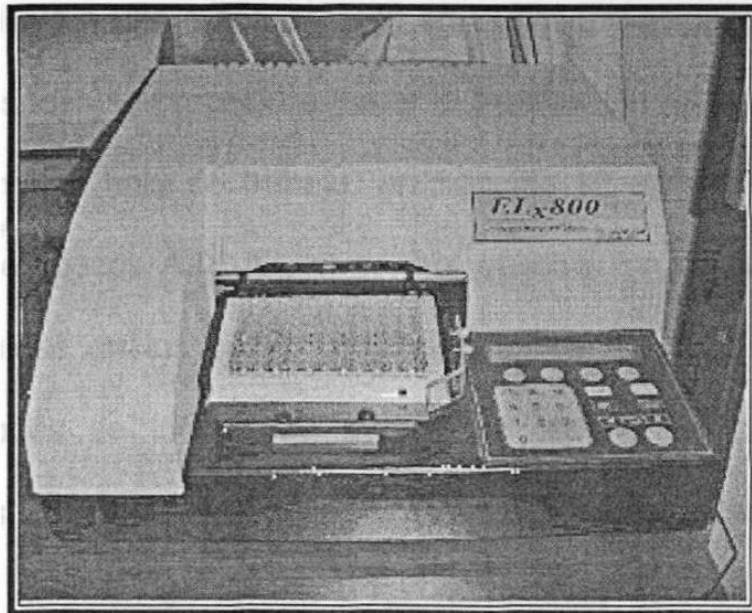


Figura 13. Lector de ELISA (ELX800 Universal Microplate Reader Lionheart Diagnostics)

2.6 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA.

2.6.1 ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA LEUCOSIS

Para la determinación de anticuerpos contra VLB en el suero del animal, se utilizo el estuche comercial de la marca VMRD, Inc. (VLB, Bovine Leukosis virus Test Kit) mediante el método de ELISA (ver Apéndice B). Se preparo la solución de lavado diluyendo 20 ml de solución de lavado concentrada con 180ml de agua destilada / deionizada para crear 200ml de solución lista para usar. Posteriormente se preparo el conjugado (100X Anticuerpo-peroxidasa) diluyendo para 96 pozos 6µl del conjugado con 5.940ml de Buffer de dilución para el conjugado. Cada muestra se diluyó a una razón de 1:25 en Buffer (amortiguador) de dilución para muestra y Después se procedió a hacer la prueba. Se obtuvieron las placas y se registraron en una hoja de trabajo, en seguida se agregaron 50 µl de control negativo en los pozos A2Y A3, el control positivo en los pozos A4 Y A5 y las muestras diluidas en los pozos correspondientes. El pozo A1 se utilizo como blanco. Después se incubo 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez cumplidos los 20 minutos se desecho el líquido en forma de canto y se lavo 3 veces con la solución de lavado y los respectivos golpes suaves en el último lavado para transferir el líquido residual al material absorbente. Posteriormente se agrego 50 µl del conjugado (100XAnticuerpo-peroxidasa) y se incubo 20 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar los 20 minutos se repitieron los lavados con el mismo procedimiento. Después de los lavados se agrego 50 µl de solución

substrato y se incubo nuevamente 20 minutos a temperatura ambiente cubierta con aluminio. Y por último se agrego la solución de interrupción. Terminando el desarrollo de la técnica se procedió a leer las placas aplicando un nivel de absorbancia al lector de ELISA de 630nm y la interpretación de los resultados se obtuvieron bajo la prueba de validación del manual de guía del Kit comercial VMRD, Inc. (VLB) (Apéndice B). La Seropositividad de algunas muestras contra el VLB se muestra en la figura 14

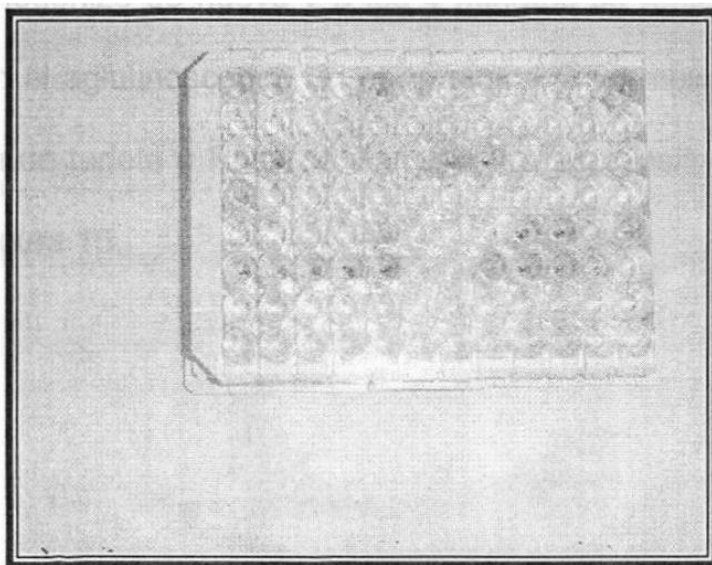


Figura 14. Placa mostrando seropositividad de algunas muestras contra el Virus de la Leucosis Bovina

2.7 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA BRUCELOSIS

2.7.1 MÉTODO DE TARJETA O ROSA DE BENGALA

Los sueros problema junto con el antígeno se mantuvieron antes de iniciar la prueba 50 minutos fuera de refrigeración para que alcanzaran la temperatura ambiente, posteriormente se colocaron 30µl de cada muestra en los cuadros de la placa de vidrio, utilizando una puntilla por cada muestra de suero. Después se colocó 30µl a un lado de cada gota de muestra dentro de la misma cuadrícula de la placa, agitando el frasco del antígeno antes de usarse. Inmediatamente se mezcló con palillos de madera, utilizando un palillo por muestra y se homogenizaron con una rotación manual suave de la placa. Transcurridos 2 minutos se homogenizó de nuevo y a los 4 minutos se realizaron las lecturas de las muestras en el aglutinoscopio. En el apéndice C se muestra más información sobre la prueba de tarjeta o Rosa de Bengala. La seropositividad a Brucelosis se muestra en la figura 15.

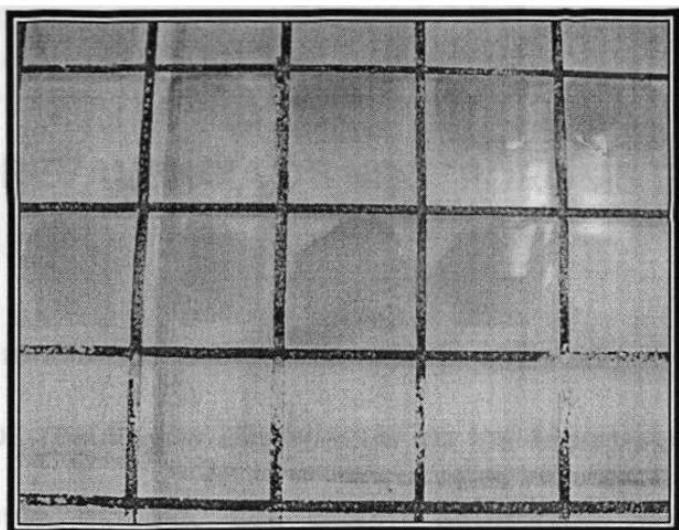


Figura 15. Seropositividad contra Brucelosis

2.8 DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA

Para determinar la seroprevalencia en los hatos estudiados se empleo la siguiente formula epidemiológica mediante el programa estadístico llamado Statistix, versión 1.0, 1996.

$$P = \frac{\text{N}^\circ \text{ seropositivos}}{\text{N}^\circ \text{ de muestreados}} \times 100$$