

ADQ. 02262  
CLASIFI. +S  
574.29  
S718m

BIBLIOTECA  
ING. BERNARDO  
QUINTANA ARRIOLA



INVESTIGACION Y  
POSGRADO

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



LICENCIATURA EN  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MANUAL DE PRACTICAS DE INMUNOLOGIA VETERINARIA:  
IMPORTANCIA E INTERPRETACIÓN

LIBRO DE PRACTICAS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO  
ZOOTECNISTA

PRESENTA

SANDRA AURELIA SOTO ARREDONDO

ASESOR

M. EN C. GUILLERMO DE LA ISLA HERRERA

Santiago de Querétaro, Marzo de 2001

## DEDICATORIA

- A MI DIOS...

Por TODAS las maravillas creadas y por su gran amor.

- A MIS PADRES...

Alejandro y Lupita

Por darme TODO, amor, apoyo, comprensión, etc. pero sobre todo por creer en mí. Este pequeño triunfo es de ustedes.

- A MI AMIGO, NOVIO Y ESPOSO...

Guillermo

Con amor y Fé en nuestra vida juntos, y por ser mi inspiración.

- A MIS HERMANOS...

Lolo, Titi, Chino, Vero, Vero Mares y Toño

Por su cariño, apoyo y ayuda en todo momento.

- A MIS ANGELITOS....

Tania, Alex y Dení, por inspirar tanto amor.

- A MIS ABUELITOS

Que nos esperan allá ARRIBA

- A MI FAMILIA Y AMIGOS (AS) de siempre

## AGRADECIMIENTOS

- A MI ASESOR

M.V.Z. Guillermo de la Isla Herrera

Por su gran apoyo y ayuda, por confiar en mí y por ser un excelente Ser Humano.

- A MIS AMIGAS Y AMIGOS

Gelos, Laura, Timón, Juja, Alejita, Eri, Claudia, Carmelita, Chícharo, Edgar, Beto, Alex, Michel.

Por su gran amistad y los bellos momentos compartidos.

- A MIS COMPAÑEROS

Por lo recorrido y todo lo que aprendimos juntos.

- A LA LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

A los maestros por todas sus enseñanzas; a la Lic. Lily, Marce, Dany, Pedro, por estar siempre dispuestos a ayudarnos.



## RESUMEN

Se realizó un Manual de Inmunología Veterinaria el cual se enfoca a la Importancia del tema y a la Interpretación de los resultados.

Cada tema presenta una introducción, el desarrollo de la práctica, la interpretación de los resultados y la bibliografía consultada por tema.

Se anexa además un glosario para la comprensión de algunos términos, pruebas de laboratorio para diagnóstico de enfermedades en distintas especies y algunos lineamientos para la interpretación de resultados.

## INTRODUCCION

El laboratorio de Inmunología es una herramienta importante en el aprendizaje de esta ciencia, que facilita el entendimiento de los mecanismos de defensa del organismo frente a los antígenos. Su aplicación práctica en el ejercicio del Médico Veterinario Zootecnista, permite hacer diagnósticos más certeros y tomar las mejores decisiones con respecto a la inmunoprofilaxis y control de enfermedades de interés veterinario, considerando su impacto en salud pública y por las pérdidas económicas que traen consigo.

Sin embargo, hemos observado que no siempre se considera de esta manera el objetivo del laboratorio de docencia, debido a que el conocimiento que reciben los alumnos en las prácticas de laboratorio no les es significativo para integrarlo a una aplicación práctica en el campo, incluyendo la interpretación de los resultados.

El presente "Manual de Prácticas de Inmunología Veterinaria: Importancia e Interpretación", además de enlistar el material y método de las prácticas, enfatiza en el marco teórico, el significado y aplicación de cada una de las prácticas contenidas en el manual y, aún más importante, la interpretación de los resultados obtenidos. Esto permite al alumno contar con las herramientas necesarias para que al enfrentarse con casos clínicos tenga la capacidad de establecer los procedimientos correctos que lo lleven a un diagnóstico certero.

En la actualidad existen manuales de Inmunología Veterinaria, pero algunos de ellos se enfocan al desarrollo de la técnica, por lo que el alumno no puede integrarlo al conocimiento teórico adquirido en la materia de Inmunología. Debido a esto, el presente Manual integra ambas cosas (teoría y técnica) para una mejor comprensión por parte del alumno. Otro aspecto importante es que se mencionan las prácticas más comunes.

Tradicionalmente cuando se necesitaba establecer en el laboratorio una prueba para el diagnóstico de una enfermedad, se empezaba desde la obtención y purificación del antígeno, la preparación de los reactivos y se buscaban técnicas que pudieran ser de fácil aplicación; se determinaba su sensibilidad y especificidad, se comparaba con una o varias pruebas estándar y una vez validada se utilizaban en el campo para obtener resultados confiables. En la actualidad es posible conseguir antígenos, reactivos o kits de diagnóstico comerciales de la mayoría de las enfermedades importantes de los animales domésticos.

Estas pruebas comerciales poseen un elevado respaldo en investigación y tecnología de punta, tienen alta sensibilidad y especificidad, lo que les da confiabilidad y constituyen un ahorro considerable de tiempo, factor clave para la toma de decisiones basadas en un rápido diagnóstico.

La serología es una excelente herramienta para el diagnóstico cuando se utiliza correctamente. No existe un método simple ni mágico para desarrollar las estrategias de muestreo ni para interpretar los resultados serológicos. Los conceptos que se presentan en este manual pueden ayudar a establecer las bases para el uso efectivo de algunas pruebas serológicas, y pretende abordar de manera sencilla su fundamento inmunológico y la interpretación de resultados.

## OBJETIVO

### Objetivo general.

- Elaborar un documento que contenga las prácticas que se llevarán a cabo en la materia de Laboratorio de Inmunología.

### Objetivos particulares.

- Proporcionar al alumno los procedimientos y el material a utilizar en las distintas prácticas a realizar.
- Hacer énfasis en la importancia e interpretación que se le debe dar a cada práctica.
- Proporcionar al docente un material de apoyo.

## INDICE GENERAL

	Pág.
- INTRODUCCION _____	1
- OBJETIVO _____	3
1. RECOLECCION, CONSERVACION Y ENVIO DE MUESTRAS SEROLOGICAS AL LABORATORIO.	
- Introducción _____	4
- Desarrollo de la práctica _____	9
- Bibliografía _____	15
2. GRUPOS SANGUINEOS EN HUMANOS Y EN ANIMALES DOMESTICOS.	
- Introducción _____	17
- Grupos sanguíneos en humanos _____	17
- Grupos sanguíneos en animales domésticos _____	20
2.1. Determinación del sistema ABO	
- Desarrollo de la práctica _____	23
- Interpretación de resultados _____	23
2.2. Determinación del factor Rh	
- Desarrollo de la práctica _____	24
- Interpretación de resultados _____	25
- Bibliografía _____	26
3. DILUCIONES	
- Introducción _____	27
- Desarrollo de la práctica _____	31
- Interpretación de resultados _____	33
- Bibliografía _____	34
4. INTRODUCCION A LA SEROLOGIA _____	35
4.1. PRUEBA DE ELISA	
- Introducción _____	39
- Desarrollo de la práctica _____	41
- Interpretación de resultados _____	44
- Bibliografía _____	45
4.2. PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA	
- Introducción _____	46
- Desarrollo de la práctica _____	47
- Interpretación de resultados _____	49
- Bibliografía _____	51

<b>4.3. PRUEBAS DE AGLUTINACION</b>	
- Introducción _____	52
- Interpretación de resultados _____	54
4.3.1 Prueba de anillo en leche _____	54
- Interpretación de resultados _____	55
4.3.2 Prueba rápida en placa (Huddleson) _____	55
- Interpretación de resultados _____	56
4.3.3 Prueba de tarjeta _____	56
- Interpretación de resultados _____	58
- Interpretación de resultados para Brucelosis _____	58
- Bibliografía _____	59
<b>4.4. PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO</b>	
- Introducción _____	60
- Desarrollo de la práctica _____	61
- Resultados _____	63
- Interpretación de resultados _____	63
- Bibliografía _____	65
<b>4.5. PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION</b>	
- Introducción _____	66
- Desarrollo de la práctica _____	67
- Interpretación de resultados _____	69
- Bibliografía _____	70
<b>5. SEROPERFILES EN CERDOS Y SU APLICACION EN MVZ</b>	
- Introducción _____	71
- Objetivo de los seroperfiles _____	72
- Interpretación de resultados _____	74
- Análisis de los seroperfiles _____	77
- Bibliografía _____	88
<b>6. PRUEBA DE TUBERCULINA</b>	
- Introducción _____	89
- Desarrollo de la práctica _____	91
- Interpretación de resultados _____	93
- Bibliografía _____	95
<b>7. DETERMINACION DE LA CALIDAD DEL CALOSTRO</b>	
- Introducción _____	96
- Desarrollo de la práctica _____	98
- Interpretación de resultados _____	99
- Bibliografía _____	100

<b>4.3. PRUEBAS DE AGLUTINACION</b>	
- Introducción _____	52
- Interpretación de resultados _____	54
4.3.1 Prueba de anillo en leche _____	54
- Interpretación de resultados _____	55
4.3.2 Prueba rápida en placa (Huddleson) _____	55
- Interpretación de resultados _____	56
4.3.3 Prueba de tarjeta _____	56
- Interpretación de resultados _____	58
- Interpretación de resultados para Brucelosis _____	58
- Bibliografía _____	59
<b>4.4. PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO</b>	
- Introducción _____	60
- Desarrollo de la práctica _____	61
- Resultados _____	63
- Interpretación de resultados _____	63
- Bibliografía _____	65
<b>4.5. PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION</b>	
- Introducción _____	66
- Desarrollo de la práctica _____	67
- Interpretación de resultados _____	69
- Bibliografía _____	70
<b>5. SEROPERFILES EN CERDOS Y SU APLICACION EN MVZ</b>	
- Introducción _____	71
- Objetivo de los seroperfiles _____	72
- Interpretación de resultados _____	74
- Análisis de los seroperfiles _____	77
- Bibliografía _____	88
<b>6. PRUEBA DE TUBERCULINA</b>	
- Introducción _____	89
- Desarrollo de la práctica _____	91
- Interpretación de resultados _____	93
- Bibliografía _____	95
<b>7. DETERMINACION DE LA CALIDAD DEL CALOSTRO</b>	
- Introducción _____	96
- Desarrollo de la práctica _____	98
- Interpretación de resultados _____	99
- Bibliografía _____	100

8. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE INMUNOGLOBULINAS  
SÉRICAS EN BECERROS CALOSTRADOS Y NO CALOSTRADOS.

- Introducción _____	101
- Desarrollo de la práctica _____	104
- Interpretación de resultados _____	107
- Bibliografía _____	108
- GLOSARIO _____	110
- ANEXO 1 _____	114
- ANEXO 2 _____	121



## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadros</b>	<b>Pág.</b>
1 Grupos sanguíneos en humanos _____	18
2 Posibles combinaciones genotípicas y fenotípicas entre hijos de padres con distintos grupos sanguíneos del sistema ABO _____	19
3 Interpretación de resultados del sistema ABO _____	24
4 Ejemplo de la proporción de las diluciones _____	28
5 Ejemplo de dilución doble seriada en 3 pasos _____	29
6 Ejemplo de dilución quintuple seriada en 4 pasos _____	30
7 Ejemplo de dilución doble seriada en 3 pasos (en proporción) _____	30
8 Resumen de la técnica de Diluciones _____	32
9 Valoración de la sensibilidad y especificidad _____	35
10 Sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas _____	36
11 Tipo de muestra de acuerdo a la enfermedad _____	47
12 Pruebas para el diagnóstico de Brucela _____	53
13 Interpretación de resultados de las pruebas de aglutinación _____	54
14 Resumen del método de Huddleson _____	56
15 Interpretación para brucelosis con animales vacunados _____	58
16 Interpretación para brucelosis con animales no vacunados _____	58
17 Resumen del método de Fijación del Complemento _____	62
18 Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación _____	69
19 Interacción entre agentes primarios y secundarios _____	76
20 Resultados de la serología efectuada inmediatamente después del inicio de un brote de PRRS _____	86
21 Resultados de la serología efectuada un año después de un brote de PRRS _____	86
22 Composición de la leche y el calostro _____	96
23 Interpretación de resultados de la determinación del calostro _____	99
24 Características de las inmunoglobulinas _____	101
25 Niveles de Ig's en becerros sanos, enfermos y muertos por diarrea _____	102

<b>14</b>	Sujeción del lechón _____	12
<b>15</b>	Obtención de sangre de yugular en cerdo adulto _____	12
<b>16</b>	Obtención de sangre de yugular de lechón _____	12
<b>17</b>	Obtención de sangre de vena auricular _____	12
<b>18</b>	Ala desprovista de plumas _____	13
<b>19</b>	Toma de muestra con papel filtro _____	13
<b>20</b>	Toma de muestra con jeringa _____	14
<b>21</b>	Sangre fluyendo hacia la jeringa _____	14
<b>22</b>	Técnica de diluciones _____	32
<b>23</b>	Técnica de ELISA indirecta _____	40
<b>24</b>	Sueros problema _____	41
<b>25</b>	Componentes del kit _____	41
<b>26</b>	Toma de las muestras con micropipetas _____	42
<b>27</b>	Colocando muestras en kit _____	42
<b>28</b>	Lavado con PBS _____	42
<b>29</b>	Adición de cromógeno _____	43
<b>30</b>	Reacción con el cromógeno _____	43
<b>31</b>	Placa en espectrofotómetro _____	43
<b>32</b>	Placa con reactivos _____	57
<b>33</b>	Mezcla del suero y el antígeno _____	57
<b>34</b>	Lecturas de resultados _____	57
<b>35</b>	Fase invisible _____	61
<b>36</b>	Fase visible _____	61
<b>37</b>	Interpretación de un resultado (+) en fase invisible _____	63
<b>38</b>	Interpretación de un resultado (+) en fase visible _____	64
<b>39</b>	Interpretación de un resultado (-) en fase invisible _____	64
<b>40</b>	Interpretación de un resultado (-) en fase visible _____	64
<b>41</b>	Sueros diluidos en microplacas _____	67
<b>42</b>	Agregando antígenos con micropipeta _____	68
<b>43</b>	Agregando eritrocitos a pozos en microplacas _____	68
<b>44</b>	Microplaca con los componentes para la reacción _____	68
<b>45</b>	Lectura de resultados _____	68
<b>46</b>	Reacción de hipersensibilidad tardía _____	89

<b>47</b>	<b>Calostrómetro</b>	<b>97</b>
<b>48</b>	<b>Graduación del calostrómetro</b>	<b>97</b>
<b>49</b>	<b>Esquema de la graduación del calostrómetro</b>	<b>98</b>
<b>50</b>	<b>Refractómetro</b>	<b>104</b>
<b>51</b>	<b>Becerro derribado</b>	<b>105</b>
<b>52</b>	<b>Introducción de aguja a yugular</b>	<b>105</b>
<b>53</b>	<b>Llenado de tubo</b>	<b>105</b>
<b>54</b>	<b>Tubo lleno</b>	<b>105</b>
<b>55</b>	<b>Prisma del refractómetro</b>	<b>106</b>

# 1. RECOLECCION, CONSERVACION Y ENVIO DE MUESTRAS SEROLOGICAS AL LABORATORIO

## INTRODUCCIÓN

El éxito en los procedimientos de laboratorio que nos pueden conducir al diagnóstico más preciso de una enfermedad, depende de varios factores, los más importantes son:

1. Selección y conservación de un número conveniente de muestras tomadas asépticamente de los sitios anatómicos más convenientes durante el estadio adecuado de la enfermedad, para el aislamiento o demostración del o de los patógenos
2. Toma de muestras de suero sanguíneo al tiempo en que el título de anticuerpos es adecuado para el diagnóstico.
3. Elección adecuada de la prueba a realizar.

Es muy importante el punto numero 1, ya que procesar muestras que no presenten las condiciones necesarias para ser procesadas (muestras hemolisadas, contaminadas, con anticoagulante, a temperaturas de conservación no adecuadas, poca cantidad, etc.) la interpretación de resultados podría ser errónea y poco confiable. Y lamentablemente esto se observa frecuentemente en laboratorios que reciben este tipo de muestras y por lo tanto se dificulta la interpretación y el diagnóstico que se les ha solicitado.

Podemos encontrar anticuerpos solubles en muchos líquidos corporales, pero en donde se presentan en mayor concentración y se obtienen con mayor facilidad es en el suero sanguíneo, por lo que es la muestra que se utiliza en las pruebas de inmunoserología. El suero se obtiene al dejar coagular la muestra de sangre, y se diferencia del plasma porque aquel se encuentra desprovisto de fibrinógeno, que en la coagulación se convierte en fibrina.

## Selección de muestras

En brotes de enfermedades, la selección de la muestra debe recaer en el animal que se encuentre en etapa temprana de la fase aguda de la enfermedad y acorde a los datos de la historia clínica. Es recomendable remitir varios especímenes de la población, sobre todo en brotes epizooticos y en animales cuyo costo por unidad no sea tan elevado. Deben elegirse varios animales en diversos estadios de la enfermedad.

Para fines de inmunoserología, se recomienda la utilización de sueros pareados, debido a que la presencia de anticuerpos para un determinado microorganismo en una única muestra de suero tiene poca importancia diagnóstica. Por lo que solo 2

muestras por lo menos, tomadas con una diferencia cronológica de 3 semanas, y que presente por lo menos 4 veces de aumento en el título hacen más certero el diagnóstico. Pero en la práctica esto casi no se realiza, por no sangrar a los animales y porque el ganadero prefiere pagar una sola vez.

### **Métodos de sujeción**

La posición adecuada y sujeción del animal son esenciales para un muestreo con éxito, en el que se debe minimizar el manejo físico, químico y psíquico, ya que la sangre tomada de un animal estresado o "adrenalizado" puede originar resultados erróneos, sobretodo cuando el suero se destinará para pruebas bioquímicas además de inmunológicas. Razón no menos importante es que los métodos de sujeción disminuyen los riesgos para el clínico.

Los métodos de sujeción se clasifican en: sujeción física, en la que se emplean instrumentos, y restricción química, cuando se administran drogas que sedan o inmovilizan en grado variable. Cuando se requiere alguna forma de restricción es recomendable utilizar primero la más simple y menos drástica, y utilizar los métodos severos cuando sea estrictamente necesario.

El trabajo del clínico con fines de diagnóstico representa un peligro potencial para él y sus asistentes, por lo que se necesita cierta asepsia y precauciones para evitar contaminaciones.

#### *Equipo mínimo necesario:*

El equipo utilizado varía de acuerdo con la especie a manejar, e incluye: cuerda (de algodón preferentemente para no dañar la piel del animal), narigón, almartigón, bozal, acial, torcedor de trompas para cerdo, potro fijo o manga de manejo (imagen 1).

En caballos se aplica el acial en el bello superior o inferior o en la oreja. En el caso de los bovinos se pueden atar ambos cuernos a un poste sólido, o se usa el narigón, o el potro de sujeción; el tipo de manejo varía entre razas y especies. El ganado productor de leche es el más dócil por el tipo de técnicas de producción.

En el ganado de Lidia es muy difícil realizar los métodos de sujeción convencionales, debido a que normalmente se encuentran en potrero o agostadero, y al mínimo manejo que se les da. En el ganado de carne se prefiere utilizar un bozal o cabezal, ya que este algunas veces se resiste al uso del narigón, que podría lastimarle los ollares.



Imagen 1. Vaca en manga de manejo

En cerdos adultos se utiliza el torcedor de trompas y los cerdos jóvenes se sujetan colocándolos en decúbito dorsal. En pequeñas especies, el animal se coloca sobre una mesa en posición de decúbito lateral; es necesario colocarle un bozal para evitar mordeduras y la presencia del dueño del animal facilita el manejo.

### **Toma de muestras**

La sangre venosa es la muestra más comúnmente obtenida de los animales y el sitio y el calibre de la aguja para la obtención dependerá de la especie.

- En los bovinos la sangre se obtiene de las venas: yugular, mamaria y coccígeas. Se recomienda el uso de agujas de calibre 16 o 18.
- En ovejas, la vena yugular es la más usada y accesible, aunque la vena femoral también se puede emplear. Se debe usar agujas de calibre 18.
- En los caballos se usa la vena yugular y se recomienda que el calibre de la aguja sea de 18 o 20.
- En el cerdo se usan las venas de la oreja, de la cola y la vena cava yugular (del lado derecho) y la aguja debe ser de calibre 20 o 21.
- En gatos y perros se utilizan las venas cefálicas y safenas, pero puede recurrirse a la vena yugular. Se usan agujas de calibre 18, 20 o 22.
- En aves adultas y pavos la muestra se obtiene de la vena braquial con aguja de calibre 21; en aves de talla pequeña se recomienda punción intracardiaca, recomendando el uso de agujas de calibre 21 o 23. Para tomar muestras de sangre en papel filtro para pruebas como inhibición de la hemoaglutinación, se utiliza la punción de la vena axial con una lanceta.

Las agujas, jeringas y tubos vacoutainer que se utilicen para la recolección de sangre deben estar perfectamente secos, de lo contrario se puede producir hemólisis. También deben estar estériles y se deben utilizar distintas agujas para cada animal.

### **Obtención del suero**

El suero sanguíneo se obtiene después de que se ha formado el coágulo, esto se puede acelerar incubando el tubo en el que se obtiene la muestra de sangre a una temperatura entre 35 y 37°C, o inclinándolo para aumentar la superficie de contacto (imagen 2) y con esto acelerar el proceso de coagulación y la retracción del coágulo, ya que el coágulo se pegará en el tapón del tubo y al destaparlo el coágulo saldrá con el tapón y permitirá dejar únicamente el suero en el tubo.





Imagen 2. Obtención del suero

El suero en la mayoría de las especies se separa sin centrifugación aunque por centrifugación el volumen que se obtiene siempre será mayor. En los bovinos permite obtener un rendimiento de más del 40% de suero.

El tiempo de coagulación para los animales sanos varía, generalmente los tiempos de coagulación son más largos en el caballo y el bovino, va desde 4 a 15 minutos, y en el perro desde 2.5 a 13 minutos. Los defectos en la coagulación de la sangre son poco frecuentes en los animales, siendo la incidencia más alta en perros.

Es importante no dejar la muestra más de 2 horas a temperatura ambiente, evitar los anticoagulantes y el daño mecánico a los eritrocitos.

### **Conservación, manejo y envío**

- **Conservación**

Las muestras de sangre para el diagnóstico serológico se toman en tubos o en frascos estériles, sin anticoagulante. El volumen mínimo deberá ser de 2 a 5 ml para los estudios rutinarios, y para un laboratorio especializado se envían de 5 a 10 ml de suero.

La refrigeración es el método de conservación recomendable para muestras serológicas, y en esta se pueden usar: hielo natural, hielo seco o líquido refrigerante.

Si es necesario conservar muestras de suero por tiempos prolongados se recomienda mantenerlos en congelación. Un suero en buenas condiciones se puede conservar hasta por 6 meses, evitando descongelar y volver a congelar por que la muestra no serviría. Las muestras que contienen coágulo solo deben conservarse 1 día.

Es importante no colocar las muestras en las puertas de los refrigeradores para evitar constantes cambios de temperatura.

- Manejo y envío

El manejo y transporte de la muestra debe efectuarse de tal manera que se evite la ruptura y filtración de los empaques y que esto altere o contamine la misma. También debe evitarse exponer las muestras a la luz solar.

Las muestras deben empacarse en materiales impermeables, y a su vez introducirse en recipientes de mayor tamaño a prueba de fugas de agua, donde se llena el espacio vacío con el refrigerante, finalmente se empacan en cajas que contengan material absorbente como papel o aserrín. Las muestras deben ser enviadas debidamente cerradas, etiquetadas y acompañadas por la historia clínica e indicando el tipo de prueba que se requiere.

Las muestras tomadas deben identificarse con los siguientes datos:

1. Nombre del propietario o del cliente
2. Descripción de los animales (especie, raza, sexo y edad)
3. Nombre o número de cada animal si es de hato o manada. Si se ignora el nombre del propietario debe acompañarse una descripción cuidadosa del animal.

La historia clínica debe señalar detalles tales como:

1. Duración de la enfermedad o brote.
2. Número de animales afectados.
3. Incidencia de mortalidad.
4. Edad de los animales afectados
5. Tipo de corral o cama.
6. Clase de alimentación.
7. Posibilidad de contacto con animales vecinos que sufran de enfermedad similar.
8. Descripción de los signos clínicos.
9. Antecedentes de enfermedades.
10. Historial de vacunación.

Existen muchas causas por las que una muestra sérica puede inutilizarse, dentro de las principales y más comunes podemos citar las siguientes:

- Hemólisis
- Lipemia o quiluria
- Desnaturalización por agentes físicos o químicos
- Cantidad insuficiente de la muestra
- Mala identificación
- Muestra con anticoagulante
- Temperatura de conservación no adecuada



## DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

### MATERIAL

- Tubos de ensaye con tapón sin coagulante
- Vacoutainer
- Etiquetas
- Alcohol
- Algodón
- Solución de acetona (2 partes) y xilol (1 parte)
- Torcedor de trompas para cerdo
- Cuerda
- Lanceta
- Papel filtro
- Jeringas

### METODO

#### MANEJO GENERAL

1. Sujeción del animal
2. Asepsia del sitio de punción
3. La punción se puede realizar mediante una jeringa o un vacoutainer.
4. Si la punción se realiza con jeringa se retrae el émbolo de la jeringa para establecer si se ha penetrado en la vena, y si es así, se mantiene la tracción hasta que se obtenga la cantidad de sangre necesaria. Una tracción del émbolo demasiado vigorosa vaciará rápidamente la vena provocando un colapso alrededor de la punta de la aguja, obstruyéndola. Al obtener la sangre necesaria se retira la aguja presionando ligeramente la piel en el punto de inserción.

Si se utiliza una jeringa para cada animal, la muestra se puede dejar en la jeringa con su debida etiqueta. Si la muestra se va a vaciar en un tubo de ensaye, se debe quitar la aguja y vaciar el contenido de la jeringa lentamente y pegando la punta de la jeringa a la pared del tubo, que deberá estar inclinado (imagen 3), para evitar hemólisis.



Imagen 3. Vaciado de sangre al tubo

Otra opción, pero menos aséptica, es puncionar la vena con la aguja sola (sin jeringa), y al momento en que sale la sangre recibirla directamente en el tubo.

El tubo vacoutainer permite la toma de muestras de forma más rápida y aséptica. Consta de tres partes: un soporte (imagen 4), en el cual se introduce la aguja conductora que penetra al tubo, y el tubo por el lado opuesto; una aguja que contiene dos partes, una que entra al vaso sanguíneo y otra que está protegida por una funda de hule delgado que se insertará en el tubo (imagen 5); y el tubo (imagen 6), que se encuentra al vacío.



Imagen 4. Soporte del tubo sobre la aguja.



Imagen 5. Aguja del vacoutainer (la parte de la aguja cubierta por el tapón azul entra a la vena, y la parte cubierta por el tapón transparente al tubo).



Imagen 6. Introducción del tubo al soporte

Realizar la punción venosa con el vacoutainer; cuando se haya introducido la aguja, debe empujarse el tubo hacia delante con la palma de la mano, para que la parte posterior de la aguja lo penetre, esto se realiza apoyándose con los dedos índice y medio en la base del soporte (imagen 7). Si la aguja se encuentra en la vena la sangre fluirá hacia el tubo debido al vacío que hay en éste (imagen 8); si no es así, se dirige la aguja hacia un sitio más profundo o más superficial, con movimientos suaves, para situarse en la luz del vaso.



Imagen 7. Penetración de la aguja al tubo.



Imagen 8. Fluído de sangre hacia el tubo con vacío.

5. Al obtener la sangre necesaria se retira la aguja presionando ligeramente la piel en el sitio de punción.
6. Se etiqueta la muestra con los datos de identificación de animal.
7. Se deja la muestra de forma inclinada a temperatura ambiente evitando los rayos solares.



8. Una vez coagulada la muestra se retira el coágulo para dejar únicamente el suero y dependiendo del tiempo que deberá transcurrir entre la toma de la muestra y su procesamiento en laboratorio, se mantendrá en refrigeración o congelación.

## BOVINOS

1. Para realizar la sujeción del animal se utiliza preferentemente la manga de manejo, lo que facilita la toma de la muestra. De ser necesario se puede usar el narigón.
2. La punción se realiza en la vena yugular o en la coccígea. Para la toma de muestra de la coccígea se levanta la cola del animal y se lleva a cabo la asepsia de la zona donde se va a tomar la muestra, con algodón y alcohol (o cualquier otro antiséptico) para evitar la contaminación de la muestra (imagen 9). Dejar secar antes de introducir la aguja. Para la punción de yugular se trata estirar la cabeza del animal hacia un lado para evidenciar la vena y se presiona con los dedos medio e índice en su salida del tórax (imagen 10). La compresión de la vena yugular utilizando una cuerda alrededor del cuello incrementa la presión de la vena lo que facilita la toma de muestras en el ganado vacuno.



Imagen 9. Asepsia para la punción de vena coccígea



Imagen 10. Asepsia de cuello

3. Puncionar en el sitio de elección para la toma de la muestra (imagen 11 y 12).



Imagen 11. Toma de sangre de la vena yugular



Imagen 12. Sangre tomada de yugular fluyendo hacia el tubo.



4. Realizar los pasos 5 al 8 del manejo general.

## CERDOS

1. Se sujeta el animal de acuerdo al tamaño de la siguiente forma: en cerdos adultos se utiliza el torcedor de trompas (imagen 13), el cual se coloca en la trompa por detrás de los colmillos del animal y se jala para inmovilizar al cerdo. Los cerdos jóvenes se sujetan colocándolos en decúbito dorsal (imagen 14).



Imagen 13. Sujeción del cerdo adulto.



Imagen 14. Sujeción del lechón.

2. La muestra se extrae de la vena yugular del lado derecho (imagen 15 y 16). También se puede obtener la muestra de la vena auricular (imagen 17). Se realiza la asepsia de la zona preferentemente con una solución que contenga dos partes de acetona por una de xilol, lo que hace más evidente la vena.
3. La muestra se puede tomar como ya se mencionó arriba, con jeringa o vacoutainer y se sigue el mismo procedimiento general. Para la toma de muestra en cerdo adulto se va a extraer la muestra con jeringa, y en el lechón con vacoutainer.



Imagen 15. Obtención de sangre de la vena yugular de un cerdo adulto.



Imagen 16. Obtención de sangre de la vena yugular de un cerdo joven.



Imagen 17. Obtención de sangre de la vena auricular de un cerdo adulto

## AVES

1. La toma de muestra de sangre en las aves se realiza de acuerdo al tamaño del ave. Siendo como sigue:  
En pollitos de 1 a 28 días por decapitación.

En pollos de 4 semanas o más de vena axial (obteniendo de 3 a 10 ml, con aguja de 20-21). También se puede obtener por medio de una lanceta en la vena axial.

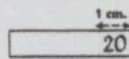
2. Para obtener sangre de la vena axial, se sujeta al ave para inmovilizarla, y se estira el ala para localizar la vena.
3. Se quitan las plumas que no permitan acceder a la vena (imagen 18).



Imagen 18. Ala desprovista de plumas

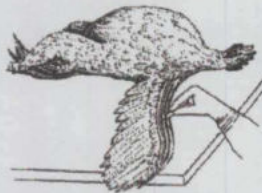
4. Cuando se requieren cantidades pequeñas de sangre para pruebas como IH, se punciona la vena con una lanceta estéril y se toma la muestra impregnando de sangre por lo menos la mitad de una tira de papel filtro de 5cm.X 1cm., cuidando de dejar seco uno de los extremos del papel (1cm) para la identificación de la muestra (imagen 19).

Identifique las tira de papel filtro abarcando 1 cm. del extremo .



Número de muestra

Punción con lanceta desechable para sangrado, en vena humeroradial.



Impregnar perfectamente de sangre, hasta la mitad de la tira de papel.

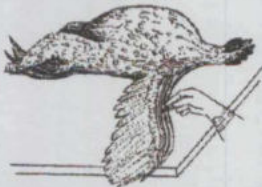


Imagen 19. Toma de muestra con papel filtro.

5. Si se requiere una cantidad mayor de muestra, se utiliza una jeringa para extraer la sangre de la misma vena (imagen 20 y 21).





Imagen 20. Toma de muestra con jeringa.



Imagen 21. Sangre fluyendo hacia la jeringa.

### Resumen de la técnica

Sujeción del animal a muestrear



Asepsia de la zona a punsionar



Introducción de la aguja(jeringa)



Vaciado de sangre al tubo



Obtención del suero



Introducción de aguja vacoutainer



Obtención del suero

## BIBLIOGRAFÍA

- Angel, G. M. 1978. Interpretación Diagnóstica de Laboratorio Clínico. Ed. Interamericana. México, D.F.
- Benjamin, M. 1984. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. Ed. Limusa. México, D.F.
- Calero, J. D. 1980. Microbiología e Inmunobiología de las Enfermedades Infecciosas. 2ª edición. Ed. Marban. Madrid, España.
- Coffin, D. L. 1986. Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F.
- Cottral, E.G. 1986. Microbiología Veterinaria. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F.
- Cunningham, C. 1971. Virología Práctica. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- De la Puente, J. 1983. Exterior y Manejo de los Animales Domésticos. UNAM, FMVZ. México, D.F.
- Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal. Influenza Aviar. Edición especial. SAGAR
- Doxey, D. L. 1987. Patología Clínica y Procedimientos de Diagnóstico Veterinario. 2ª edición. Ed. Manual Moderno. México, D.F.
- Enríquez, C. 1995. Ganado Vacuno, Exterior, Razas y Calificación. Ed. por EV. César Enríquez González. México.
- Enríquez V. A. 2000. Manual de Toma y Envío de Muestras. Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Querétaro. Laboratorio de Patología Animal. Querétaro, México.
- Enríquez, V. A. Comunicación personal. Dir. Laboratorio de Patología Animal. Calamanda, Querétaro.
- Gibbons, W. J. 1967. Diagnóstico Clínico de las Enfermedades del Ganado. Ed. Interamericana. México, D.F.
- Jain, N. 1993. Essentials of Veterinary Hematology. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia, EUA.
- Jawetz, E. 1981. Manual de Microbiología Médica. Ed. Manual Moderno. México, D.F.
- Kraft, H. 1998. Métodos de Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria de Mamíferos Domésticos. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Kelly, W. R. 1983. Diagnóstico Clínico Veterinario. Ed. Continental. México, D.F.
- Kolmer, J. 1972. Diagnóstico Clínico por los Análisis de Laboratorio. 3ª edición. Ed. Interamericana. México, D. F.
- Lenette, E. 1987. Manual de Microbiología Clínica. 4ª edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Medway, W., Prier, J. y Wilkinson, J. S. 1986. Patología Clínica Veterinaria. Ed. UTEHA. México, D.F.
- Montaraz, C. 1989. Apuntes de Inmunología Veterinaria. UNAM. México, D.F.

- Morilla, A. 1985. Avances en Enfermedades del Cerdo. Ed. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F.
- Morilla, A. y Bautista, C. 1986. Manual de Inmunología. Ed. Diana. México, D.F.
- Olsen, R. G. 1983. Inmunología e Inmunopatología de Animales Domésticos. Ed. Manual Moderno. México, D.F.
- Zamora, E., Burgos, G., Díaz, Z., Díaz, G. y Talavera, R. 1997. Selección, Conservación y Envío de Muestras para Diagnóstico de Laboratorio. Memorias del Curso Teórico-Práctico. UNAM. México, D.F.
- Tizard, I. 1995. Inmunología Veterinaria. 4ª edición. Ed. Interamericana -Mc Graw Hill. México, D.F.



## 2. GRUPOS SANGUINEOS EN HUMANOS Y EN ANIMALES DOMESTICOS

### INTRODUCCION

- Sistema ABO

En 1900 Landsteiner definió los principales isoantígenos (aloantígenos) de glóbulos rojos en humanos, determinó la existencia en los glóbulos rojos de dos determinantes antigénicos que llamó A y B.

Los individuos que poseían el determinante A eran grupos de sangre A, y los que poseían el determinante B del grupo sanguíneo B. Otros tenían glóbulos rojos que no aglutinaban con ninguno de los sueros y se llamaron C. Más tarde se comprobó que el grupo C, ahora conocido como O, no expresaba un antígeno único.

Se estableció que los individuos tienen anticuerpos naturales dirigidos contra determinantes antigénicos que no existen en sus propios eritrocitos. Por lo que, individuos con sangre de grupo A poseen anticuerpos anti-B y viceversa; mientras que los individuos del grupo sanguíneo O tienen anticuerpos de los dos tipos, anti-A y anti-B.

Posteriormente estudiantes de Landsteiner descubrieron otro grupo que tenía antígenos A y B sin anticuerpos, que ahora se conocen como tipo AB.

El sistema ABO posee dos rasgos característicos únicos que no se encuentran en ningún otro sistema de grupos sanguíneos:

- 1) La presencia de aglutininas fuertemente reactivas en el suero de los que carecen de los antígenos correspondientes.
- 2) La presencia regular de antígenos ABH en muchas células hísticas y de sustancias ABH en las secreciones de los secretores.

- Grupo genético de antígenos ABO

Los antígenos del grupo sanguíneo son glicoproteínas y glicolípidos, y su potencial antigénico guarda relación con las porciones carbohidrato.

Estos antígenos tienen importancia evidente para las transfusiones, por lo que la administración de células sanguíneas que tienen antígenos A o B a una persona con anticuerpos (aglutininas) naturales anti-A o anti-B puede originar una reacción de transfusión que ponga en peligro la vida. En estas reacciones también puede intervenir gran número de otros antígenos del grupo sanguíneo.

La presencia de anticuerpos anti-A o anti-B en el suero puede provocar enfermedad hemolítica del recién nacido, esto debido a que los anticuerpos IgG maternos cruzan la placenta y se fijan a los eritrocitos fetales,

provocando su hemólisis. La enfermedad hemolítica provocada por ABO suele ser más leve que la desencadenada por incompatibilidad Rh.

Los antígenos de los hematíes son estructuras químicas que proporcionan propiedades específicas a su superficie y que hasta ahora sólo pueden detectarse por la reactividad de los hematíes con anticuerpos que corresponden a estos antígenos. La mayoría de estas reacciones Ag-Ac implican la aglutinación de los hematíes, por eso los anticuerpos se suelen denominar hemaglutininas y los antígenos hemaglutinógenos.

Landsteiner descubrió la aglutinación que se producía al mezclar los glóbulos rojos de un sujeto con los de otro, observó también que solamente se necesitaban dos antígenos para explicar los cuatro grupos sanguíneos: el primero tenía un antígeno (A), el segundo tenía el otro (B), el tercero tenía los dos (AB), y el cuarto no tenía ningún antígeno (O) (cuadro 1).

Cuadro 1. Grupos sanguíneos en humanos

Fenotipo del grupo sanguíneo	Genotipo	Antígenos en el eritrocito	Anticuerpos en el suero	Distribución en %
A	AA, AO	A	Anti-B	42
B	BB, BO	A	Anti-A	10
O	OO	Ni A, ni B	Tanto anti-A, como anti-B	45
AB	AB	Tanto A como B	Ni anti-A, ni anti-B	3




Por lo tanto en el mismo sujeto no puede coexistir el antígeno y el anticuerpo correspondiente, lo que se llama "Regla de Landsteiner", la coexistencia del antígeno (Ag) y del anticuerpo (Ac) común o correspondiente sería incompatible con la vida, ya que la reacción serológica tendería a destruir los glóbulos rojos del individuo (cuadro 2).

Existen en el comercio sueros tipificantes perfectamente estandarizados tanto anti-A, como anti-B y anti-AB; es recomendable utilizar al realizar las pruebas el suero anti-AB especialmente para detectar las variantes débiles de los grupos A y B, así mismo sirve para identificar el grupo O. Estas pruebas pueden realizarse tanto en placa como en tubo, siendo esta última la más sensible.

Mediante el empleo de anticuerpos adecuados, se pueden identificar antígenos en los glóbulos rojos, y los propios glóbulos constituyen el indicador de la combinación Ag-Ac, esta combinación Ag-Ac puede producirse de varias maneras según las condiciones del experimento o de la prueba, la misma reacción Ag-Ac puede manifestarse de diversas maneras. En general se prefiere como punto final de aglutinación.

Cuadro 2. Posibles combinaciones genotípicas y su fenotipo entre hijos de padres con distintos grupos sanguíneos del sistema ABO.

			GRUPO DE LA MADRE											
			A				B				AB		O	
			AA		AO		BB		BO		AB		OO	
GRUPO DEL PADRE	A	AA	AA	AA	AA	AO	AB	AB	AB	AO	AA	AB	AO	AO
			AA	AA	AA	AO	AB	AB	AB	AO	AA	AB	AO	AO
		AO	AA	AA	AA	AO	AB	AB	AB	AO	AA	AB	AO	AO
			AO	AO	AO	OO	BO	BO	BO	OO	AO	BO	OO	OO
	B	BB	AB	AB	AB	BO	BB	BB	BB	BO	AB	BB	BO	BO
			AB	AB	AB	BO	BB	BB	BB	BO	AB	BB	BO	BO
		BO	AB	AB	AB	BO	BB	BB	BB	BO	AB	BB	BO	BO
			AO	AO	AO	AO	BO	BO	BO	OO	AO	BO	OO	OO
AB	AB	AA	AA	AA	AO	AB	AB	AB	AB	AA	AB	AO	AO	
		AB	AB	AB	BO	BB	BB	BB	BO	AB	BB	BO	BO	
O	OO	AO	AO	AO	OO	BO	BO	BO	OO	AO	BO	OO	OO	
		AO	AO	AO	OO	BO	BO	BO	OO	AO	BO	OO	OO	

Grupo sanguíneo A	
Grupo sanguíneo AB	
Grupo sanguíneo B	
Grupo sanguíneo O	

• Factor Rh

El sistema Rh es el segundo isoantígeno de glóbulos rojos que tienen importancia en medicina clínica. El factor Rh descrito por Landsteiner y Wiener en 1940, es un antígeno que existe en 85% de todos los eritrocitos humanos, y en los del mono Rhesus. Este antígeno común fue descubierto por estudios de hemaglutinación con glóbulos rojos humanos frente a sueros preparados en conejos contra eritrocitos de mono Rhesus. No se conocen anticuerpos naturales contra el antígeno Rh.

El sistema Rhesus está constituido por unos 40 antígenos distintos, cinco de los cuales revisten una importancia especial.

La terminología de Fisher-Race se basa en la suposición de que se heredan de cada progenitor tres genes situados en un loci muy próximos. Los alelos más comunes que pueden ocupar dichos loci se signan con los símbolos D y d, C y c, E y e. Cada gen (con excepción de d) codifican un antígeno específico, que puede ser detectado en la membrana de hematíes. La presencia o ausencia del antígeno D es la que determina si un individuo es Rh positivo o negativo.

El factor Rh es un aglutinógeno presente en los glóbulos rojos de la mayoría de los individuos, su importancia radica en que cuando un individuo no posee este aglutinógeno si son inyectados glóbulos rojos que lo contienen, reacciona frente a esta sustancia extraña para él, formando anticuerpos capaces de reaccionar con

los glóbulos rojos que contienen este factor lisándolos y aglutinándolos, debido a que este fenómeno ocurre tanto *in vitro* como *in vivo* puede dar como consecuencia una severa reacción postransfusional aún con desenlace fatal, así mismo puede presentarse este fenómeno en mujeres que carecen del factor Rh y que al concebir un hijo que ha heredado el factor Rh del padre reacciona frente al factor Rh del hijo formando anticuerpos que van a reaccionar con los glóbulos rojos del hijo destruyéndolos y dando lugar a un fenómeno de eritroblastosis fetal.

- Variable débil del antígeno d ( $D^u$ )

La variante  $D^u$ , es una variante débil, poco frecuente entre los individuos caucasoides pero común entre los individuos de raza negra (22%). Los hematíes  $D^u$  generalmente dan reacciones débiles o negativas con el anti-D, siendo generalmente detectados gracias a la prueba indirecta de la antiglobulina (prueba  $D^u$ ). Los hematíes  $D^u$  pueden ser clasificados en tres categorías.

- $D^u$  adquirido
- $D^u$  variante
- $D^u$  hereditario

Variante  $D^u$ . El antígeno d presenta una estructura que consta como mínimo de cuatro partes. Si faltan una o más partes del antígeno, este puede tener una expresión débil. Un individuo con la variedad  $D^u$  puede producir aloanticuerpos contra la parte del antígeno d que le falta. Por esta razón los individuos que pertenecen a dicha variante deben ser transfundidos con sangre Rh negativo. Los centros de transfusión sanguínea efectúan la prueba para el factor  $D^u$  a todos sus donantes Rh negativos, ya que la sangre  $D^u$  inyectada a un receptor Rh negativo puede producir en este último una sensibilización al antígeno D.

- Grupos sanguíneos en animales domésticos

La complejidad de los sistemas de grupos sanguíneos eritrocíticos en animales varía mucho. Van desde los sistemas simples, como el L de los bovinos, que consisten en dos alelos que controlan un sistema aloantigénico único, hasta el sistema B, que es muy complejo ya que contiene varios cientos de alelos o fenogrupos que, junto con los otros grupos sanguíneos del ganado vacuno, pueden producir millones de combinaciones de grupos sanguíneos únicos.

Gran parte de los antígenos de grupos sanguíneos son componentes que integran la membrana celular, existen otros que son moléculas solubles que se encuentran libres en el suero, la saliva y otros líquidos corporales. Ejemplo de estos son los antígenos J de bovinos, los antígenos R de ovejas, los antígenos A y O de cerdos y los antígenos Tr de perros.

La determinación de la compatibilidad de los grupos sanguíneos no se realiza sistemáticamente en animales, solo en equinos, aunque repetidas transfusiones de un mismo donante pueden provocar shock anafiláctico.

### Bovinos

En esta especie existen 11 sistemas de grupos sanguíneos: A, B, C, F, J, L, M, S, T, Z y R, de los cuales B y J son los más comunes.

Debido a su complejidad es imposible obtener sangre bovina de un animal donador que sea absolutamente idéntica a la del receptor, por lo que se ha sugerido que existen suficientes combinaciones antigénicas diferentes para proporcionar un carácter identificador único para cada bovino, por lo que proporciona un método ideal para la identificación de animales de registro.

El antígeno J es un lípido que se encuentra libre en los líquidos corporales, por lo que no se considera un antígeno verdadero.

### Ovejas

Los grupos sanguíneos de la ovejas se parecen a los de los bovinos. En esta especie existen siete grupos: A, B, C, D, M, R y X. Al igual que en los bovinos el grupo B es el más complejo y contiene por lo menos 52 alelos diferentes, y también presentan un grupo de antígenos solubles, que es el R.

Los eritrocitos de ovejas se usan con frecuencia como herramienta en la investigación inmunológica, debido a que son una fuente económica de antígenos.

### Cerdos

Se han identificado 15 sistemas de grupos sanguíneos, van desde la A hasta la O, de los cuales el más importante es el A. Este sistema contiene dos factores, A y O. Su expresión se controla por un gen llamado S (secretor). Las sustancias A y O son antígenos solubles que se encuentran en suero.

### Caballos

En esta especie existen siete sistemas de grupos sanguíneos: A, C, D, K, P, Q y U. La mayor importancia clínica de los grupos sanguíneos de los equinos se debe a que la enfermedad hemolítica en el potrillo recién nacido es frecuente. En las mulas, cuyas diferencias antigénicas entre madre y padre son grandes, cerca de 8 a 10% de los productos pueden estar afectados. En los pura sangre, la frecuencia de aparición es menor y va de 0.05 al 2% de los potrillos. Por los que a pesar de que hasta en el 14% de las gestaciones, la yegua y el semental son incompatibles, algunos potrillos pueden resultar afectados de manera subclínica.

### Perros

En esta especie existen por lo menos 11 sistemas de grupos sanguíneos: A, TR, B, C, D, F, J, K, L, M y N. Solamente el sistema A es de importancia clínica. Cerca del 60% de los perros son A positivos.

Rara vez se observa un síndrome de anemia hemolítica neonatal en cachorros lactantes de una perra A negativa con isoaglutininas anti-A. los isoanticuerpos son transmitidos al cachorro en forma oral a través del calostro. Si los cachorros son A negativos no se produce daño.

### Gatos

Solo se ha publicado un grupo sanguíneo de importancia en esta especie, el sistema AB. Los gatos pueden ser A, B o AB. Cerca del 75 al 95% de los gatos

son A positivos, entre 5 y 25% son B positivos y menos del 1% son AB. Es esencial realizar pruebas cruzadas antes de alguna transfusión, ya que si son incompatibles se provoca la muerte.

#### Pollos

Los pollos tienen por lo menos 12 grupos sanguíneos con alelos múltiples. El sistema B es el más importante de los sistemas de histocompatibilidad.

- Prueba cruzada

Las reacciones de incompatibilidad sanguínea se producen cuando los eritrocitos con un aglutinógeno asociado se introducen en el sistema vascular del animal receptor, cuyo suero contiene aglutininas antagónicas específicas.

En los animales es común que las aglutininas o estén presentes a muy bajas concentraciones o falten totalmente, por lo que es improbable que la primera transfusión sanguínea, excepto en el caballo, provoque una severa reacción intravascular.

Para evitar la posibilidad de provocar reacciones de aglutinación o hemólisis, puede realizarse una prueba de compatibilidad mezclando suero del receptor con células del donante. Se mezclan dos gotas de sangre del donante con una solución de citrato al 3.85 y se añaden dos gotas de suero del receptor sobre un portaobjetos, agitando suavemente. Si los eritrocitos del donador son lisados o aglutinados por el suero del receptor no se debe realizar la transfusión con estos eritrocitos.

Otra alternativa es inyectar una pequeña cantidad de sangre (200 ml en una vaca adulta) y esperar 10 minutos. Si no se produce reacción en ese tiempo, el resto de la sangre puede inyectarse sin riesgo.

- Enfermedad hemolítica del recién nacido (HDN)

Las hembras pueden sensibilizarse a los eritrocitos alogénicos no sólo por transfusiones de sangre incompatible administradas por razones clínicas, sino por fuga de eritrocitos fetales hacia la corriente sanguínea materna a través de la placenta. En los animales sensibilizados por una de estas vías, los anticuerpos para los eritrocitos alogénicos se encuentran en el calostro. Cuando los ingiere un animal recién nacido, esos anticuerpos del calostro se absorben a través de la pared intestinal y llegan a la circulación. Si los anticuerpos reaccionan contra los antígenos presentes en los eritrocitos del animal recién nacido, se destruirán. La enfermedad originada por esta destrucción eritrocitaria masiva aparece en muchas de las especies de animales domésticos.

## DESARROLLO DE LA PRACTICA

### 2.1 Determinación del sistema ABO por la técnica de Beth-Vicent (técnica en placa)

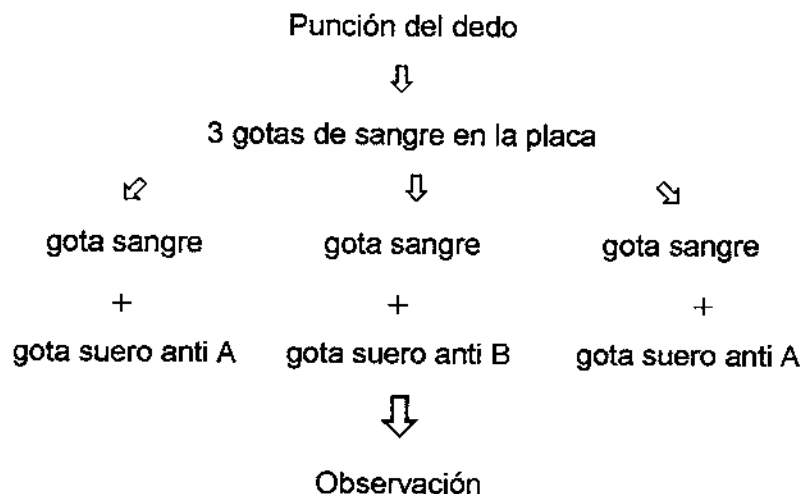
#### MATERIAL

- Placa excavada
- Palillos
- Lanceta
- Pipetas Pasteur
- Suero anti-A
- Suero anti-B
- Suero anti-AB

#### METODO

1. Obtener sangre de un integrante del equipo por medio de una punción en el dedo con la lanceta, colocando una gota de suero en cada uno de los pozos de la placa excavada.
2. A cada una de las gotas de sangre agregar una gota de suero anti-A, una gota de suero anti-B y una gota de suero anti-AB respectivamente, evitando que se mezclen entre sí.
3. Cada una de las muestras se mezcla con palillos diferentes.
4. Observar si hay aglutinación. No debe colocarse la placa cerca de una fuente luminosa ya que el calentamiento puede dispersar o debilitar la aglutinación. Las reacciones de aglutinación se producen en pocos segundos, el tiempo máximo para llevar a cabo la lectura de la reacción es de tres minutos.

#### Resumen de la técnica



## INTERPRETACION DE RESULTADOS

De acuerdo al cuadro 3 se determinará el grupo sanguíneo al que pertenece la sangre empleada.

Cuadro 3. Interpretación de resultados del sistema ABO

Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Grupo sanguíneo
-	-	-	O
+	-	-	A
-	+	-	B
+	+	-	AB

- El tipo de sangre A, tiene en su superficie el determinante antigénico A por lo que aglutina con el suero anti-A.
- El tipo de sangre B, tiene en su superficie el determinante antigénico B por lo que aglutina con el suero anti-B
- El tipo de sangre AB, tiene en su superficie el determinante antigénico A y el determinante antigénico B, por lo que aglutina con el suero anti-A, el suero anti-B y el suero anti-AB.
- El tipo de sangre O, no tienen en su superficie el determinante antigénico A ni el B, por lo que no aglutina con ningún antisuero.

### 2.2 Determinación del factor Rh

#### MATERIAL

- Suero anti-Rh
- Pipetas Pasteur
- Portaobjetos
- Palillos
- Lanceta

#### METODO

1. En un portaobjeto limpio se coloca con una pipeta, una gota de suero anti-Rh.
2. Obtener sangre de un integrante del equipo por medio de una punción en el dedo con la lanceta.
3. Se añade una gota de sangre a la gota de antisuero. Mezclar con un palillo.
4. Esperar algunos segundos, máximo 3 minutos para observar alguna reacción de aglutinación. No debe colocarse el portaobjetos cerca de una fuente luminosa ya que el calentamiento puede dispersar o debilitar la aglutinación.



## Resumen de la técnica

Punción del dedo



gota de sangre en la placa

+

gota suero anti Rh



Observación

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Si se observa una reacción de aglutinación, indica que la sangre en estudio es Rh positivo, o sea, que contiene el antígeno Rh.
- La falta de aglutinación indica que la sangre problema es Rh negativa, no contiene el antígeno Rh.

### 3. DILUCIONES

#### INTRODUCCION

Las soluciones son mezclas entre distintas sustancias o componentes que se pueden encontrar a concentraciones diferentes según el tipo de solución. El componente de una solución que se encuentra en la mayor cantidad, generalmente se llama disolvente y es el que indica el estado de la solución; y los otros componentes se llaman solutos.

El agua es el disolvente más importante de la naturaleza, siendo la que contiene mayor cantidad de sustancias sólidas, líquidas y gaseosas disueltas. La solubilidad de los gases disminuye y la de los sólidos aumenta a medida que se eleva la temperatura del agua.

Para una solución determinada, la cantidad de soluto disuelto en una cantidad dada de disolvente, es la concentración del soluto. Las soluciones que contienen una concentración relativamente alta de soluto, se llaman soluciones concentradas. Cuando las concentraciones del soluto es baja, se llaman soluciones diluidas.

Existen muchos tipos de soluciones; de acuerdo a la forma de expresar la cantidad de soluto en el solvente, la solución puede ser:

- a) Proporcional (dilución).
- b) De parte por millón.
- c) Porcentual.
- d) Molar.
- e) Molal.
- f) Normal.
- g) Equivalente.

#### Elaboración de diluciones

Una expresión de dilución nos indica siempre una parte de un "principio activo cualquiera", contenida en un total de partes. Se puede decir que es una expresión de proporciones. Así por ejemplo:

Ejemplo .- una dilución 1:4 de suero en solución salina nos indica:

1 parte de suero (solute)  
3 partes de solución salina (diluyente)  
↓  
4 partes en total

Ejemplo .- una dilución 1:250 de cuaternario de amonio en agua se necesita:

1 parte de cuaternario de amonio (soluto)  
 249 partes de agua (diluyente)  
 ↓  
 250 partes en total

Como se observa en los ejemplos, la forma correcta de expresar la dilución consiste en decir en que está, o en que diluyente se realizará la dilución (solución salina, agua, etc.)

La expresión indica proporción solamente por parte, sin importar el volumen (cuadro 4).

Cuadro 4. Ejemplo proporción en la dilución 1:4

	Proporción	Volúmenes				
		2 ml	4 ml	1 l	0.25 ml	1.2 ml
Soluto	1 parte	2 ml	4 ml	1 l	0.25 ml	1.2 ml
Diluyente	3 partes	6 ml	12 ml	3 l	0.75 ml	3.6 ml
Total	4 partes	8 ml	16 ml	4 l	1.0 ml	4.8 ml

El término "realizar una dilución" se aplica generalmente cuando el "principio activo cualquiera" se encuentra disperso homogéneamente en un diluyente (es decir, se encuentra en solución y su presentación física es un líquido) y se requiere que la concentración sea disminuida debido a que la cantidad requerida sea pequeña y difícil o casi imposible emplear las balanzas para pesarla o que se encuentre en la naturaleza o comercialmente como una solución (ejemplo: suero sanguíneo, alcohol o ácido sulfúrico).

La concentración puede ser disminuida cuantas veces sea necesario ("n"); y para ello podemos utilizar "n" tipos de diluciones.

Ejemplo.- realizar una dilución **doble** de ácido clorhídrico en agua, en un volumen de 25 ml.

Dilución **doble**: 1 : 2

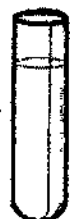
ácido clorhídrico + agua → dilución doble  
 1 parte            1 parte            2 partes



12.5 ml



12.5 ml



25 ml

**Ejemplo.-** realizar una dilución quintuple de ácido clorhídrico en agua, en un volumen de 25 ml.

Dilución quintuple: 1 : 5

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ parte de ácido clorhídrico} & = & 5 \text{ ml} \\ \hline 4 \text{ partes de agua} & = & 20 \text{ ml} \\ 5 \text{ partes en total} & = & 25.0 \text{ ml} \end{array}$$

**Ejemplo.-** realizar una dilución 1:250 de ácido clorhídrico en agua, en un volumen de 25 ml.

Dilución: 1 : 250

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ parte de ácido clorhídrico} & = & 0.1 \text{ ml} \\ \hline 249 \text{ partes en agua} & = & 24.9 \text{ ml} \\ 250 \text{ partes en total} & = & 25.0 \text{ ml} \end{array}$$

Para obtener el volumen de una parte de la dilución (factor de dilución), bastará dividir el volumen deseado entre las partes de la dilución.

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{volumen final}}{\text{número de partes de la dilución}}$$

Posteriormente se multiplicará el valor de una parte por el número de partes que ocupa el diluyente, como se señala en el siguiente ejemplo:

**Ejemplo.-** Dilución doble: 1 : 2

$$1 \text{ parte} = \frac{25 \text{ ml}}{2} = 12.5 \text{ ml}$$

Para reacciones serológicas es frecuente utilizar diluciones seriadas; estas son dobles, triples, cuádruples, logarítmicas decimales, etc.

Las diluciones logarítmicas decimales corresponden a diluciones décuples pero se expresa generalmente en forma logarítmica decimal utilizando la base 10 de la siguiente manera:

$$\begin{array}{rcl} 1:10 & = & 10^{-1} \\ 1:100 & = & 10^{-2} \\ 1:1000 & = & 10^{-3} \end{array}$$

**Ejemplo.-** realizar una dilución doble seriada en 3 pasos (cuadro 5), partiendo de una dilución de 1 : 5.

Cuadro 5. Ejemplo de dilución doble seriada en 3 pasos

Dilución original	Dilución doble seriada		
	1	2	3
1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40
X2	X2	X2	Factor de dilución

La "X" indica el tipo de dilución. Ejem. Dilución quintuple: X5, dilución doble: X2, etc.



**Ejemplo.-** realizar una dilución quintuple seriada en 4 pasos (cuadro 6), partiendo de una dilución de 1 : 5

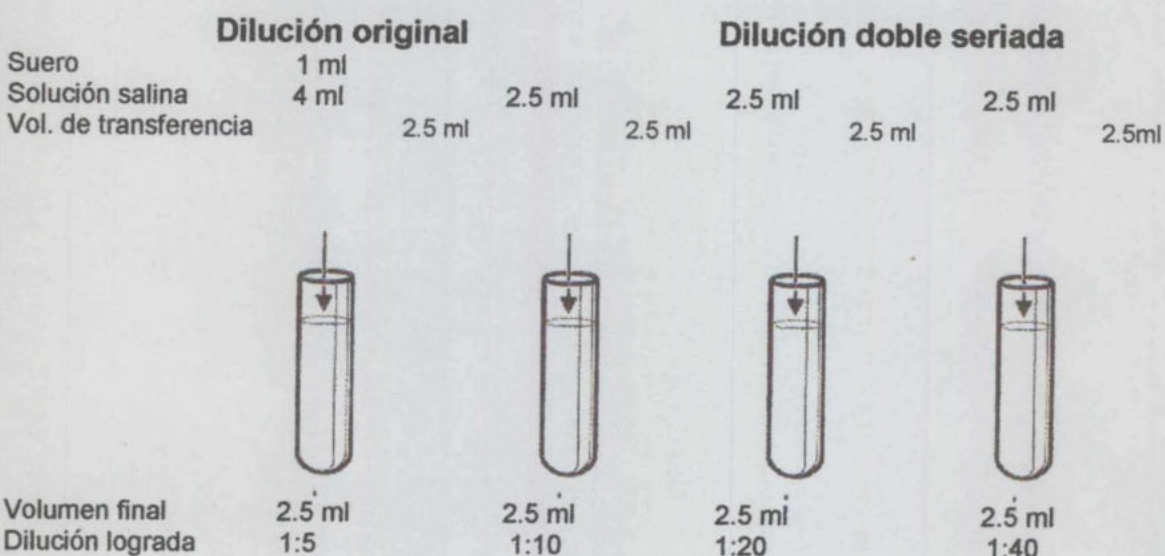
**Cuadro 6.** Ejemplo de dilución quintuple seriada en 4 pasos

Dilucion original	Dilución doble seriada			
	1	2	3	4
1 : 5	1 : 25	1 : 125	1 : 625	1 : 1325
X5	X5	X5	X5	Factor de dilución

Como se mencionó anteriormente, la dilución indica una proporción sin importar el volumen en que se encuentre. Para demostrar lo anterior y señalar al mismo tiempo los pasos de la elaboración de diluciones seriadas, a continuación se ejemplifica el ejemplo de dilución doble seriada en 3 pasos (cuadro 7), partiendo de una dilución de 1 : 5, con un volumen final de 2.5 ml.

**Cuadro 7.** Ejemplo de dilución doble seriada en 3 pasos (en proporción).

	Dilucion original	Dilución doble seriada		
		1	2	3
Solución del principio activo	1 ml			
Diluyente	4 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Volumen de transferencia	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Dilución lograda	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40
Volumen final	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml



El principio activo o soluto, siempre que se encuentre en solución, estará expresado en unidades de peso o en unidades internacionales y como se explicó anteriormente, las diluciones servirán para disminuir la concentración.

**Ejemplo.** Una solución contiene 1 mg de principio activo en cada mililitro y se realiza una dilución de 1 : 5, ¿qué concentración final tiene en 1 ml?

**RAZONAMIENTO:** si la dilución indica proporciones, entonces 1: 5

1 parte de solución  
4 partes de diluyentes  
5 partes en total

la dilución indica dividir la concentración original entre el número total de partes, así:

$$\frac{1 \text{ mg}}{5 \text{ ml (partes en total)}} = 0.2 \text{ mg en 1 ml}$$

**COMPROBACION**

A) 
$$\frac{1 \text{ ml conteniendo 1 mg} + 4 \text{ ml diluyente}}{5 \text{ ml}} \quad 1 : 5$$

$$\therefore \frac{1 \text{ mg}}{5 \text{ ml (partes en total)}} = 0.2 \text{ mg en 1 ml}$$

B) 
$$\frac{0.5 \text{ ml conteniendo 0.5 mg} + 2.0 \text{ ml diluyente}}{5 \text{ ml}} \quad 1 : 5$$

$$\therefore \frac{1 \text{ mg}}{2.5 \text{ ml (partes en total)}} = 0.2 \text{ mg en 1 ml}$$

## DESARROLLO DE LA PRACTICA

### MATERIAL

- Tubos de ensaye
- Azul de metileno concentrado
- Solución salina fisiológica
- Pipetas de 10 ml
- Gradillas

- Colocar 5 tubos de ensaye en la gradilla y numerarlos.
- A cada tubo de ensaye poner 8 ml de solución salina con la pipeta.
- Al tubo número 1 se le agrega 2 de azul de metileno y se mezcla , este va a corresponder a la dilución original, 1:5.
- Del tubo no. 1 se toma con la pipeta 2 ml de la solución y se coloca en el tubo no. 2 y se mezcla; así posteriormente hasta el tubo no. 5.
- Al tubo no. 5 que corresponde a la dilución 1:3125, se le extrae 2 ml para lograr el volumen final de 8 ml.

### Resumen de la técnica (cuadro 8, imagen 22)

Cuadro 8. Resumen de la técnica de diluciones

	Dilución original	DILUCIÓN QUINTUPLE SERIADA			
		1	2	3	4
Azul de metileno	2 ml				
Solución salina	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml
Volumen de transferencia	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Dilución lograda	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125
Volumen final	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml

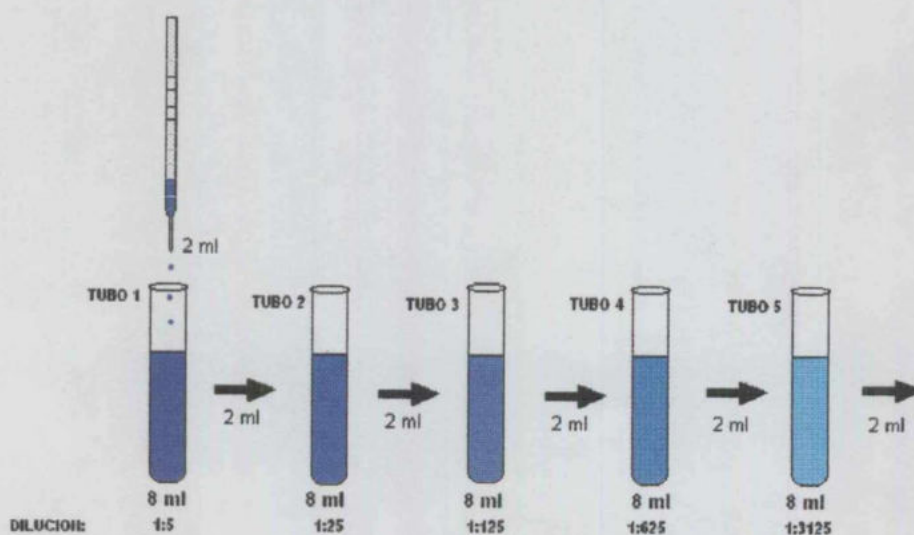


Imagen 22. Técnica de diluciones.

## INTERPRETACION DE LAS DILUCIONES

Como sabemos, en las pruebas serológicas es común la realización de diluciones seriadas para disminuir la concentración de anticuerpos en un suero determinado, con esto la reacción en distintas pruebas tales como, aglutinación, precipitación, fijación de complemento entre otras, será evidente en los animales cuyos sueros tengan mayor título de anticuerpos. Esto nos permite cuantificar los títulos y determinar la positividad o negatividad de los animales en cuestión.



## BIBLIOGRAFÍA

- Enciclopedia Práctica del Estudiante. Tomo 8. 1982. Ed. Promexa. México, D.F.
- Harper, A., Rodwell, V. y Mayes, P. 1980. Manual de Química Fisiológica. 7ª edición. Ed. Manual Moderno. México, D.F.
- Mohanty, S. and Dutta, S. 1988. Virología Veterinaria. Ed. Panamericana. México, D.F.
- Morilla, A. y Bautista, C. 1986. Manual de Inmunología. Ed. Diana. México, D. F.
- Ocampo, D. 1993. Fundamentos de Química. Ed. Publicaciones Cultural. México, D.F.
- Tizard, I. 1996. Inmunología Veterinaria. 5ª edición, Ed. Interamericana, Mc Graw Hill. México, D.F.
- Vega, D. (editor). 1995. Manual de Técnicas de Laboratorio de Prácticas de Inmunología y Virología. UNAM.

En el cuadro 10 se muestran algunas pruebas diagnóstica y la sensibilidad y especificidad que presentan.

Cuadro 10. Sensibilidad y especificidad de algunas pruebas diagnósticas

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Prueba de tarjeta para brucelosis	95	98
Prueba de anillo en leche para <i>Brucella abortus</i>	90	56
Fijación del complemento para <i>Brucella abortus</i>	97	99
ELISA para <i>Brucella abortus</i>	96	99
Cultivo fecal para la presencia de <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	40	100
Prueba intradérmica de Johnina	54	79
Inmunodifusión en agar para <i>M. paratuberculosis</i>	55	56

- Factores a considerar en una prueba inmunológica

#### a) Antígeno

Cuando se va a realizar una prueba de diagnóstico se debe determinar qué antígeno del microorganismo o parásito es el que se desea detectar. Debido a que, por ejemplo, en el estado evolutivo de algunos parásitos, conforme atraviesa por diferentes etapas larvarias y hasta llegar a adultos, se van modificando sus antígenos tanto somáticos como de excreciones y secreciones. En el caso de bacterias u otros microorganismos, algunas veces las cepas patógenas tienen antígenos de virulencia de los cuales carecen las cepas no patógenas.

#### b) Patogenia y respuesta inmune

Se debe tomar en cuenta si la respuesta inmune que desencadena determinado microorganismo es celular o humoral para poder establecer el tipo de prueba a realizar. Por ejemplo, en el caso de algunos parásitos intracelulares que estimulan una respuesta de inmunidad celular, como la leishmania, además de una prueba serológica es recomendable seleccionar una prueba que detecte inmunidad celular, como la intradermorreacción para observar una respuesta de hipersensibilidad retardada.

#### c) Suero

Cuando un animal recibe un estímulo antigénico por un agente infeccioso, en algunas horas se reclutan células plasmáticas producen anticuerpos específicos que empiezan a circular. Lentamente se incrementa el nivel de anticuerpos en el plasma hasta que, dependiendo de la sensibilidad de la prueba serológica, pueden llegar a ser detectados. La primera inmunoglobulina que aparece es la IgM, seguida de la IgG, y cada una tiene propiedades que la diferencian.

Además de los factores anteriores se deben tomar en cuenta las siguientes particularidades para elegir la prueba a utilizar y tener menos probabilidad de errores:

- Si los animales han sido vacunados.
- Utilización de sueros pareados, debido a que la presencia de anticuerpos para un determinado microorganismo en una única muestra de suero tiene poca

importancia diagnóstica. Por lo que solo 2 muestras por lo menos, tomadas con una diferencia cronológica de 3 semanas, y que presenten por lo menos 4 veces de aumento en el título hacen más certero el diagnóstico.

- Muestra representativa de la población a evaluar.
  - Utilizar pequeñas cantidades de suero y de antígeno
  - Ser lo suficientemente sensible para detectar niveles bajos de anticuerpos y debe ser específica para los anticuerpos que se buscan.
  - La prueba debe ser estandarizada y validada en relación con la especie animal con que se esté trabajando, ya que los animales no se comportan igual en cada una de las pruebas inmunológicas.
  - Debe ser reproducible. Se deben obtener los mismos resultados en pruebas repetidas de la misma muestra y por diferentes laboratorios.
  - Ser sencilla para aprenderla y llevarla a cabo.
  - No debe ser afectada por factores inespecíficos. El suero y distintos líquidos del organismo contienen aglutininas, sustancias neutralizantes, anticomplementarias o tóxicas que causan falsos resultados.
  - El equipo y los reactivos que se empleen deben ser de fácil adquisición, económicos y de larga duración.
  - Los antígenos que se utilicen en la prueba deben estar inactivados y no representar un riesgo para el personal.
- Tipo de reacciones durante el diagnóstico

Las reacciones del antígeno con el anticuerpo que son útiles para el diagnóstico, se han dividido en varios tipos:

- a. Reacciones primarias. Son las reacciones en las cuales se une el antígeno al anticuerpo, y como no son visibles a simple vista, se usan métodos indirectos en los que el antígeno o el anticuerpo se marca, puede ser con enzimas (pruebas de ELISA), con sustancias opacas al microscopio electrónico (como la ferritina), con fluorocromos (Inmunofluorescencia) y marcadores radiactivos (RIA: Radioinmunoanálisis) entre otros.
- b. Reacciones secundarias. Una vez que ocurre la reacción primaria y si el antígeno es polivalente, es decir, si tiene varios determinantes antigénicos, conforme pasa el tiempo se observa una reacción notoria a simple vista. Si el antígeno es soluble se observa precipitación; si es particulado, se presenta aglutinación, o puede haber lisis de un sistema indicador, como son los glóbulos rojos en la fijación del complemento. Estas reacciones generalmente tardan varias horas en desarrollarse y son la base de las pruebas *in vitro*. Dentro de las reacciones secundarias probablemente podría incluirse la respuesta que tienen los linfocitos *in vitro* cuando sus receptores reconocen a un antígeno y se producen diversas manifestaciones como son la multiplicación

de las células y la liberación de linfocinas o de citotoxicidad, las que pueden usarse para el diagnóstico.

- c. Reacciones terciarias. Son reacciones que se manifiestan visiblemente, generalmente de tipo inflamatorio. Estas ocurren cuando el reconocimiento del antígeno por el anticuerpo o el linfocito sensibilizado ocurre *in vivo*. Se denominan de hipersensibilidad y pueden ser de tipo temprano (I y III) o de tipo tardío (IV), según el tiempo que tardan en aparecer, y son la base de las pruebas intradérmicas para el diagnóstico.

Dentro de las pruebas de reacciones terciarias se encuentran las pruebas en sistemas vivos, ejemplos de este tipo de prueba son las de Neutralización y las de Protección. Si un microorganismo o un antígeno desempeñan actividades biológicas, es posible evaluar los anticuerpos por su capacidad para neutralizar tales actividades, tales como, hemólisis de eritrocitos, lisis de células nucleadas y enfermedad o muerte en los animales. Las reacciones de este tipo están sujetas a variaciones, ya que en un amplio intervalo de dosis tienden a cambiar tanto en microorganismos como en antígenos. Por lo que los resultados que se obtienen en una prueba única de neutralización positiva o negativa no suelen tener gran significado.

Pruebas de protección. Estas pruebas constituyen una forma de análisis de neutralización que se realiza totalmente *in vivo*. Es posible medir las propiedades protectoras de un antisuero específico, si se le administra en diluciones crecientes a un grupo de animales de experimentación, y estos se inoculan después con una dosis estándar de microorganismos patógenos o de toxinas. Las pruebas de protección dan una medida directa de la eficacia terapéutica de un antisuero y presentan grandes variaciones experimentales, por la diferencia en susceptibilidad a la infección y por otros factores. Para obtener resultados útiles es necesario tener cantidades relativamente grandes de animales y estandarizar la inoculación.

## 4.1. PRUEBA DE ELISA

### INTRODUCCION

La prueba de ELISA (ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas) está considerada como una prueba de unión primaria, ya que se realiza combinando antígenos, anticuerpos y un marcador enzimático para identificar y medir las cantidades de complejos inmunitarios que se hayan formado. Otra característica de la prueba de ELISA y de otro tipo de pruebas de unión primaria, es que permite detectar y cuantificar tanto anticuerpos como antígenos.

La técnica de ELISA presenta una alta sensibilidad y especificidad, por lo que se ha convertido en una prueba muy utilizada para obtener un diagnóstico más confiable.

Para la realización de esta técnica se cuenta con productos comerciales que poseen un elevado grado de tecnología, además son confiables y constituyen un ahorro considerable de tiempo y en ocasiones de dinero, ya que la utilización de estos productos (kits) evitan la necesidad de elaborar antígenos, de establecer técnicas (como cultivos celulares), de preparación de reactivos, etc. que requieren de equipo, personal especializado, más tiempo y hasta de mayor costo algunas veces.

Debido a lo anterior muchas pruebas de diagnóstico que antes utilizaban otros métodos se han convertido en pruebas de ELISA.

En la prueba de ELISA el antígeno o anticuerpo primero se fija a un soporte inerte y luego se hace reaccionar con el antígeno o anticuerpo correspondiente, que se encuentra marcado con una enzima (conjugado); se lava el conjugado que no reaccionó y se mide la capacidad de hidrólisis de la enzima sobre su correspondiente sustrato.

El resultado final es el cambio de color del sustrato incoloro de la enzima, a un producto coloreado, el cual se puede observar a simple vista o medirse con un espectrofotómetro. La intensidad del color será proporcional a la cantidad de antiglobulinas ligada a la enzima que se haya captado, la cual, a su vez, será proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero que se está analizando.

Las técnicas de ELISA pueden ser clasificadas como competitivas y no competitivas, dependiendo de que el antígeno libre y el antígeno ligado a una enzima o fijado a una fase sólida compita por un número limitado de sitios activos de anticuerpos; o de que si al antígeno o anticuerpo a medir se le permite reaccionar con un exceso de reactante inmune.



A continuación se hace mención de algunas de las diversas técnicas de ELISA:

- En la prueba indirecta de ELISA para anticuerpos, se llenan huecos en placas de poliestireno con una solución de antígeno. Los antígenos proteínicos se unen al poliestireno, de tal manera que se pueda extraer el antígeno no unido realizando un lavado enérgico, lo que permite que los hoyos de la placa permanezcan cubiertos con el antígeno. De esta manera se conservan las placas y se pueden utilizar hasta que se requiera.

Al realizar la prueba, el suero que se va a probar se coloca en la placa para que los anticuerpos específicos del suero puedan unirse al antígeno que se encuentra en la placa. Después se incuba, y se realiza un lavado para extraer el anticuerpo no unido, la presencia de los anticuerpos que se unieron se puede detectar agregando una antiglobulina químicamente unida a una enzima. Este complejo se une a los anticuerpos, se vuelve a incubar y a lavar y posteriormente se detecta y se mide al agregar el sustrato para la enzima correspondiente. La enzima y el sustrato se seleccionan de una manera que en cada tubo se produzca un producto que tenga un cierto color (imagen 23). La intensidad del color será proporcional a la cantidad del reactivo utilizado y unidos.

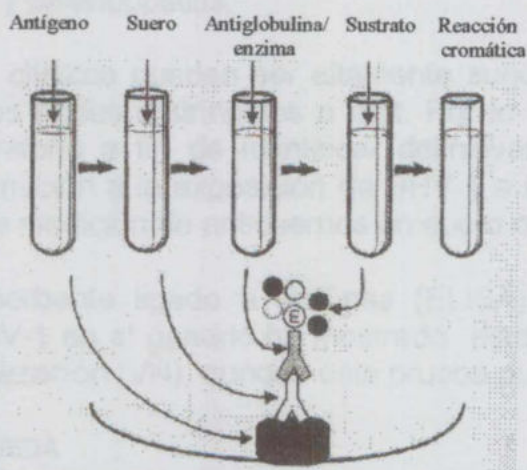


Imagen 23. Técnica de ELISA indirecta

- La prueba de captura, se utiliza para reconocer a un antígeno, por ejemplo Rotavirus en heces de bovinos. En este caso el pozo se encuentra sensibilizado con un anticuerpo contra el antígeno, se adiciona una muestra diluida de heces y si se encuentra el Rotavirus lo captura el anticuerpo. Se adiciona un segundo anticuerpo contra el Rotavirus conjugado con una enzima y se adiciona el sustrato/cromógeno. Si hubo Rotavirus el pozo va a desarrollar color.

- Prueba de mancha (Dot ELISA). Con esta técnica la reacción antígeno anticuerpo se visualiza como una mancha sobre membrana, por lo que no se necesita colorímetro. El fundamento es que los antígenos o anticuerpos se encuentran inmovilizados en una membrana y éstos pueden capturar o los antígenos o los anticuerpos.

- 40 -



Imagen 24. Sueros problema.



Imagen 25. componentes del kit

- 41 -

## INTERPRETACION DE RESULTADOS

- Se considera positivo a la prueba de tarjeta para brucela si se observan conglomerados o grumos.
- En un resultado negativos no se detectan cambios en 4 minutos.
- Es importante tener en cuenta las inmunizaciones del animal para la interpretación correcta de los resultados.

### INTERPRETACION DE RESULTADOS PARA LAS PRUEBAS DE BRUCELOSIS

La interpretación de los resultados obtenidos de las pruebas efectuadas será de la siguiente manera:

- Los resultados de la prueba de tarjeta y de la prueba de anillo en leche, tendrán únicamente dos clasificaciones: negativo y positivo.
- La interpretación de los títulos sanguíneos de las pruebas serológicas de placa y tubo se encuentran en los cuadros 15 y 16 :

Cuadro 15. Interpretación para brucelosis con animales vacunados.

DILUCIONES				INTERPRETACIÓN
1:25	1:50	1:100	1:200	
-	-	-	-	Negativo
	-	-	-	Negativo
+	-	-	-	Negativo
+	-	-	-	Negativo
+	+	-	-	Negativo
+	+		-	Sospechoso
+	+	+	-	Sospechoso
+	+	+		Sospechoso
+	+	+	+	Positivo

Cuadro 16. Interpretación para brucelosis con animales no vacunados.

DILUCIONES				INTERPRETACIÓN
1:25	1:50	1:100	1:200	
-	-	-	-	Negativo
	-	-	-	Negativo
+	-	-	-	Negativo
+		-	-	Sospechoso
+	+	-	-	Sospechoso
+	+		-	Sospechoso
+	+	+	-	Positivo
+	+	+		Positivo
+	+	+	+	Positivo

- (-) NO HAY AGLUTINACIÓN  
 (+) HAY AGLUTINACIÓN COMPLETA  
 (|) HAY AGLUTINACIÓN INCOMPLETA

## BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, J. y Good, R. 1977. Inmunología Clínica. Ed. Salvat. Barcelona, España.
- Barret, J. 1980. Inmunología. Ed. Centro Regional de Ayuda Técnica. México, D.F.
- Carpenter, P. 1975. Inmunología y Serología. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F.
- Gibbons, W. 1970. Diagnóstico Clínico de las Enfermedades del Ganado. Ed. Panamericana. México, D.F.
- <http://www.fei.es/protocolo/sero01.htm>
- <http://www.oie.int/norms/MANUAL/A>
- Jawets, E., Melnick, J. y Adalberg, E. 1981. Manual de Microbiología Médica. Ed. Manual Moderno. México, D.F.
- Lenette, E. 1987. Manual de Microbiología Clínica. 4ª edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Montaraz, C. 1989. Apuntes de Inmunología Veterinaria. UNAM. México, D.F.
- Morilla, A. y Bautista, C. 1986. Manual de Inmunología. Ed. Diana. México, D. F.
- Morilla, A. y González, V. 1997. Introducción al Diagnóstico Inmunológico de las Enfermedades de los Animales Domésticos. INIFAP- BTI- SAGAR.
- Olsen, R. G. 1983. Inmunología e Inmunopatología de Animales Domésticos. Ed. Manual Moderno. México D.F.
- Tizard, I. 1996. Inmunología Veterinaria. 5ª edición. Ed. Interamericana, Mc Graw Hill. México, D.F.
- Ruiz, C. 1986. Brucelosis. 3ª edición. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F.
- SARH. 1990. Normas y Procedimientos de las Campañas Nacionales Contra la Tuberculosis Bovina y la Brucelosis. Programa de acreditación de MVZ. CNMVZM. México, D.F.
- Vega, D. (editor). 1995. Manual de Técnicas de Laboratorio de Prácticas de Inmunología y Virología. UNAM. México, D.F.

## 4.4. PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO

### INTRODUCCION

El complemento es un constituyente normal que aparece en todos los sueros frescos, aunque el suero fresco del cobayo es el más eficiente en su calidad de fuente de complemento en las pruebas hemolíticas. El sistema de complemento consiste en un conjunto de enzimas que interactúan entre sí, y su activación da como resultado una cascada de reacciones, y esta última causa ruptura de la membrana celular y la destrucción de células o de microorganismos invasores. Una de las funciones normales del sistema del complemento es proteger contra las enfermedades provenientes de complejos inmunitarios, al unirse a estos y promover su eliminación a través de un componente eritrocitario (CD35) y fagocitosis, actúa para eliminar los complejos inmunitarios de la sangre.

El principio de la prueba de fijación del complemento consiste en que el complemento se fija en la formación de un complejo anticuerpo-antígeno específico, produciéndose entonces la lisis del componente antigénico. En estas pruebas los sueros desconocidos se calientan a 56°C durante 30 minutos, con objeto de destruir cualquier complemento que pudiera contener, y entonces se añade una cantidad conocida de complemento (suero de cobayo) a cada suero objeto de la prueba. Después de añadirle el antígeno conocido se incuba la mezcla a 37°C, y si se forma un complejo específico se consume el complemento y se mide la cantidad de complemento libre y remanente, agregando un sistema indicador, el sistema hemolítico, que consiste de eritrocitos de camero cubiertos de anticuerpos.

La lisis de dichos eritrocitos (que se hace evidente al volverse rojo transparente las soluciones) es un resultado negativo, ya que indica que el complemento no se fijó y que dicho anticuerpo no se encontraba en el suero problema

La ausencia de lisis (la cual se demuestra porque la suspensión de eritrocitos es turbia) indica un resultado positivo.

La prueba de fijación del complemento es útil en el diagnóstico de varias enfermedades, tales como: actinobacilosis en caballos, tripanosomiasis, brucelosis bovina, tuberculosis bovina, enfermedad de Johne en bovinos y ovinos, hepatitis infecciosa canina, moquillo canino y en el muermo en todas las especies domésticas, para la cual se considera la prueba más segura de diagnóstico.

### Principio de la prueba

La prueba consta de dos fases:

1. La primera es llamada fase invisible. En esta fase se trabaja con un primer sistema antígeno-anticuerpo, enfrentando el suero sospechoso (elemento



desconocido), el antígeno específico (elemento conocido) y el complemento (imagen 35).

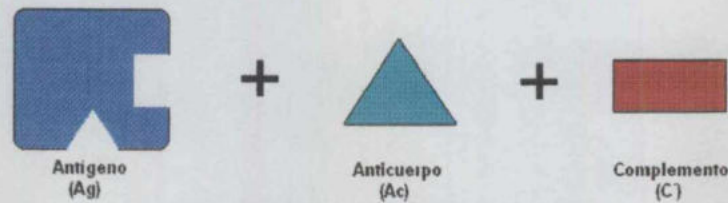


Imagen 35. Fase invisible

2. La segunda, es la fase visible. En la cual se agrega un segundo sistema antígeno-anticuerpo **sistema hemolítico**, formado por glóbulos rojos de ovino y hemolisina. El cual va a ser el sistema indicador de la prueba (imagen 36).

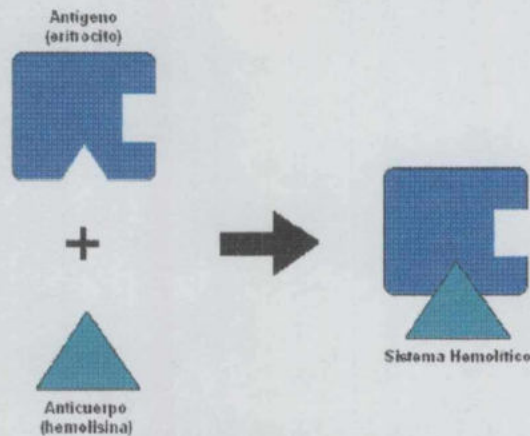


Imagen 36. Fase visible

## DESARROLLO DE LA PRUEBA

### MATERIAL

- Gradilla.
- Tubos de ensayo (10 por suero)
- Pipetas serológicas (automática)
- Solución salina fisiológica (SSF)
- Suero problema inactivado
- Sistema hemolítico (SH)
- Complemento titulado (C')
- Antígeno titulado
- Baño maría



## METODO

- Primera fase

1. Colocar los tubos en la gradilla e identificarlos de la siguiente manera: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, SH, C'.
2. Con la pipeta depositar:
  - 0.1 ml de suero en el tubo 1
  - 0.4 ml de SSF en el tubo número 1
  - 0.2 ml de SSF en los tubos del 2 al 8
  - 0.6 ml de SSF en el tubo SH
  - 0.4 ml de SSF en el tubo C'
3. Homogeneizar el tubo 1 y desechar 0.1 ml para tener un volumen de 0.4 ml.
4. Realizar una dilución doble seriada, transfiriendo 0.2 ml del tubo 1 al tubo 2, homogeneizar en cada tubo antes de transferir y continuar el procedimiento hasta el tubo 8 (desechar 0.2 ml en el tubo 8).
5. Con otra pipeta agregar 0.2 ml de antígeno a los tubos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.
6. Con otra pipeta agregar 0.2 ml de complemento a los tubos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, C' (observar que el tubo SH no lleva C').
7. Agitar vigorosamente la gradilla e incubar los tubos en baño maría a 37°C durante 30 minutos.

- Segunda fase

8. Con una nueva pipeta agregar 0.4 ml de sistema hemolítico a todos los tubos.
9. Agitar la gradilla e incubar los tubos en baño maría a 37°C durante 15 minutos.

### Resumen de la técnica (cuadro 17)

Cuadro 17. Resumen del método de Fijación del Complemento

Fase invisible										
Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	SH	C'
Dilución del suero	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	-	-
SSF (ml)	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.6	0.4
Suero (ml)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Volumen de transferencia	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-	-
Antígeno (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-	-
Complemento (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-	-
<b>INCUBAR EN BAÑO MARÍA 30 MINUTOS</b>										

Al agregar el SH en la fase visible, como no hay C' libre este sedimenta y no se observa hemólisis (imagen 38).

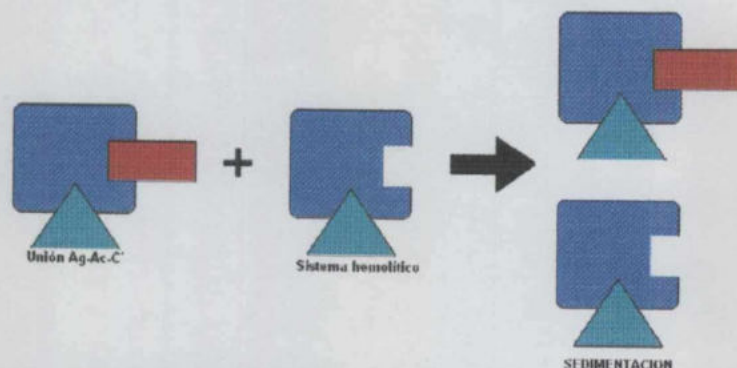


Imagen 38. Interpretación de un resultado (+) en la fase visible

- Interpretación de un resultado negativo:

Si en la fase invisible, el suero no tiene anticuerpos contra el antígeno, no se produce la unión Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac), por lo que el C' no se fija a esta unión y queda libre (imagen 39).

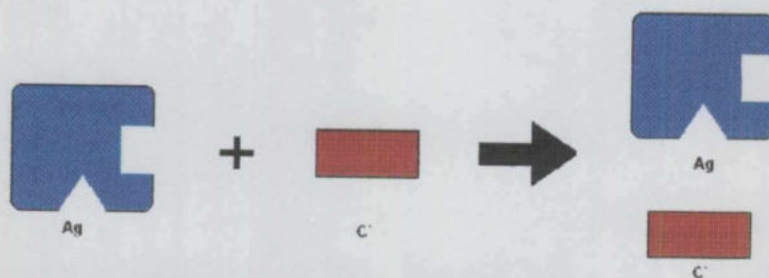


Imagen 39. Interpretación de un resultados (-) en la fase invisible

Al agregar el SH en la fase visible, como hay C' libre este se une al SH (que es una unión Ag-Ac) y se observa hemólisis (imagen 40).

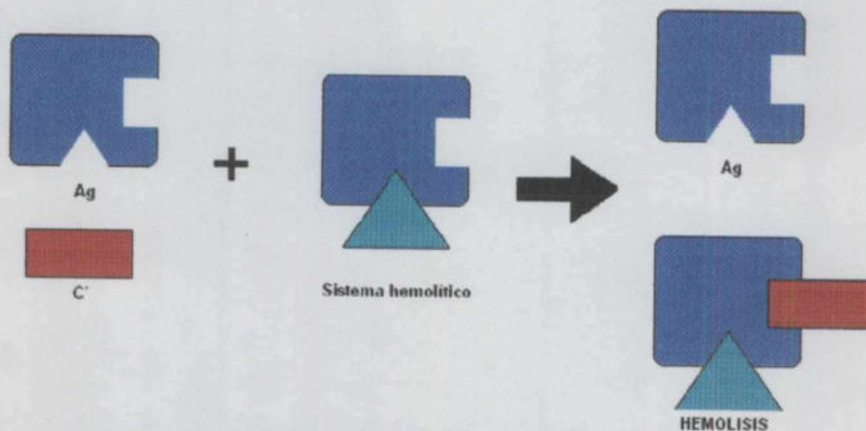


Imagen 40. Interpretación de un resultado (-) en la fase visible

## BIBLIOGRAFIA

- Barret, J. 1980. Inmunología. Ed. Centro Regional de Ayuda Técnica. México, D.F.
- Carpenter, P. 1975. Inmunología y Serología. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F.
- Fudenberg, H., Stites, D., Caldwell, J. y Well, V. 1980. Manual de Inmunología Clínica. 2ª edición. Ed. Manual Moderno. México, D.F.
- Gibbons, W. 1970. Diagnóstico Clínico de las Enfermedades del Ganado. Ed. Panamericana. México, D.F.
- <http://www.fei.es/protocolo/sero01.htm>
- <http://www.oie.int/norms/MANUAL/A>
- Morilla, A. y Bautista, C. 1986. Manual de Inmunología. Ed. Diana. México, D. F.
- Morilla, A. y González, V. 1997. Introducción al Diagnóstico Inmunológico de las Enfermedades de los Animales Domésticos. INIFAP- BTI- SAGAR.
- Olsen, R. G. 1983. Inmunología e Inmunopatología de Animales Domésticos. Ed. Manual Moderno. México D.F.
- Outteridge, p. 1988. Veterinary Immunology. Ed. Academic Press. EUA
- Tizard, I. 1996. Inmunología Veterinaria. 5ª edición. Ed. Interamericana, Mc Graw Hill. México, D.F.
- Rose, N., Friedman, H. and Fahey, J. 1986. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3th edition. Ed ASM. Washington, EUA.
- Ruiz, C. 1986. Brucelosis. 3ª edición. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F.
- SARH. 1990. Normas y Procedimientos de las Campañas Nacionales Contra la Tuberculosis Bovina y la Brucelosis. Programa de acreditación de MVZ. CNMVZM. México, D.F.
- Vega, D. (editor). 1995. Manual de Técnicas de Laboratorio de Prácticas de Inmunología y Virología. UNAM. México, D.F.



## 4.5. PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

### INTRODUCCION

Muchos virus aglutinan eritrocitos de mamíferos y aves al unirse. Este proceso se inhibe con anticuerpos contra dichos virus, al bloquear sus sitios de unión.

La inhibición de la aglutinación de eritrocitos recubiertos de antígeno por el antígeno homólogo, es un método muy sensible y específico para detectar pequeñas cantidades de antígeno soluble en la sangre u otros líquidos tisulares. El principio de este análisis es que el anticuerpo preincubado con antígenos homólogos solubles o de reacción cruzada será "inactivado" cuando se incuba con eritrocitos recubiertos de antígenos.

La detección de la hemaglutinación inducida por virus sirve de prueba preliminar cuando se trata de identificar virus; la inhibición de este fenómeno por un anticuerpo se utiliza tanto como un método para identificar un virus específico, como para medir las concentraciones de anticuerpos en el suero.

Entre los microorganismos hemaglutinantes están los mixovirus, los ortomixovirus y los paramixovirus, los virus alfa, los flavivirus y los bunyavirus, algunos adenovirus, reovirus, parvovirus y coronavirus. También algunos micoplasmas, como *Mycoplasma gallisepticum*.

Las pruebas de inhibición de la hemaglutinación se llevan a cabo de dos maneras principalmente. En la primera (a veces llamada procedimiento alfa) se mantiene constante la cantidad de virus que se agrega a cada tubo, mientras el suero problema se disuelve de manera seriada. Primero se debe titular el virus para determinar su actividad hemaglutinante; es frecuente utilizar 4 u 8 veces la dosis hemaglutinante mínima.

Después se mezclan los virus y anticuerpos y se dejan así durante un periodo predeterminado, antes de agregar a cada tubo una suspensión de eritrocitos lavados. El título de la inhibición de la hemaglutinación (IH) del suero se obtiene multiplicando la más alta de las diluciones del suero que inhibe la hemaglutinación, por el número de unidades hemaglutinantes de virus que participaron.

El otro método para estimar los niveles de anticuerpos por inhibición de la hemaglutinación consiste en agregar una cantidad estándar de antisuero a cada tubo, en tanto que se hacen diluciones seriadas de una suspensión de virus cuya actividad hemaglutinante es conocida (este método es llamado beta). Es una técnica útil en los laboratorios en que hay que ensayar cantidades muy grandes de suero, ya que los virus deben diluirse una sola vez, al principio de cada día de pruebas, y no es necesario hacer diluciones seriadas de cada uno de los sueros problemas. Al comparar el título hemaglutinante del virus en un suero normal y en un suero problema, se puede estimar el efecto inhibitor del suero problema.

La técnica que se describe va ser el correspondiente al método beta (suero diluido-virus constante).

Para diagnosticar la influenza, la reacción de IH se realiza tomando suero de los animales enfermos durante el estado agudo y en la convalecencia y practicando la reacción simultáneamente con los 3 tipos de antígenos víricos de la influenza. Un aumento del título IH en 4 veces o más durante la convalecencia se considera significativo. Si solamente hay un aumento equivalente al cuádruple, deben investigarse nuevamente los sueros para confirmar los resultados.

## DESARROLLO DE LA PRUEBA

### MATERIAL

- Gradilla con 10 tubos de ensaye o microplaca
- Pipetas serológicas (automática)
- Frasco con solución salina fisiológica (SSF)
- Suero de pollo inactivado a 56°C/30
- Virus de Influenza Aviar (IA) conteniendo 8 unidades hemaglutinantes (UHA)/0.25 ml.
- Glóbulos rojos de pollo lavados y concentrados a 0.75%
- Cinta adhesiva

### METODO

1. Identificar consecutivamente los tubos de ensaye (también se pueden utilizar microplacas para realizar la prueba) cada una con diluciones doble seriadas desde 1/5 a 1/320 y tres controles: virus (CV), suero (CS) y glóbulos rojos (CGR).
2. Realizar diluciones dobles seriadas del suero comenzando con la dilución 1/5 en un volumen inicial de 0.5 ml y trabajar con los controles (imagen 41).

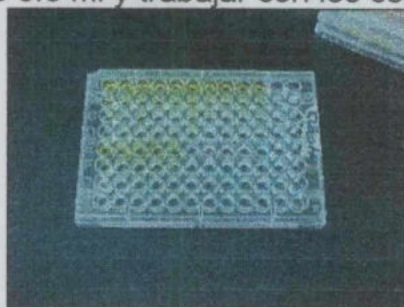


Imagen 41. Sueros diluidos en microplacas

3. Con una pipeta depositar SSF a todos los tubos en diferentes cantidades: 0.4 ml al tubo no. 1, 0.25 ml del tubo 2 al 7, 0.25 ml al CV, 0.25 ml al CS y 0.5 ml al CGR.
4. Agregar con la misma pipeta 0.1 ml del suero al primer tubo y 0.25 ml al CS, homogeneizar y posteriormente transferir 0.25 al siguiente tubo, así



consecutivamente hasta el tubo de la dilución 1/320 del que se desechará 0.25 ml.

5. Con otra pipeta limpia añadir 0.25 ml de virus de IA con 8 UHA/0.25 ml en los 8 tubos de la dilución del suero y al CV (imagen 42).



Imagen 42. Agregando antígeno con micropipeta

6. Homogeneizar el contenido de los tubos agitando la gradilla.
7. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
8. Con otra pipeta limpia agregar 0.25 ml de glóbulos rojos a todos los tubos incluyendo los controles (imagen 43).



Imagen 43. Agregando eritrocitos a pozos de microplaca.

9. Homogeneizar el contenido de los tubos nuevamente.
10. Incubar a temperatura ambiente (imagen 44) y realizar la lectura a intervalos de 15, 30, 45 y 60 minutos examinando el aspecto de los glóbulos rojos acumulados en el fondo del tubo (imagen 45).

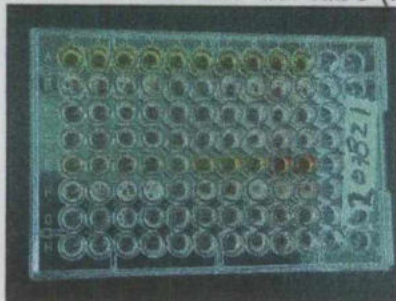


Imagen 44. Microplaca con todos los componentes para la reacción.

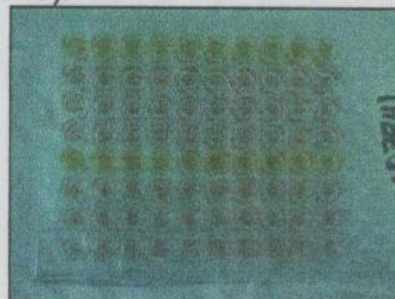








Imagen 45. Lectura de resultados observando en la 6ª fila 2 pozos con aglutinación de eritrocitos.



### Resumen de la técnica (cuadro 18)

Cuadro 18. Prueba de inhibición de la hemaglutinación (método beta)

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DILUCIONES DEL SUERO	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/350	CS	CV	CGR
SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA (ml)	0.4	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5
SUERO (ml)	0.1							0.25		
VOLUMEN DE TRANSFERENCIA (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25			
VIRUS CON 8 UHA	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25		0.25	
INCUBAR A TEMPERATURA AMBIENTE 10 MINUTOS										
GLÓBULOS ROJOS DE POLLO AL 0.75% (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
INCUBAR A TEMPERATURA AMBIENTE Y HACER LECTURA A INTERVALOS DE 15, 30, 45 Y 60 MINUTOS										
LECTURA FINAL										
				↑ PUNTO FINAL						

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- PUNTO FINAL DEL SUERO (PFS): es la más alta dilución del suero capaz de inhibir en un 100% la aglutinación de los glóbulos rojos.
- TITULO DE INHIBICIÓN DEL SUERO: inverso de PFS x no. UHA del virus.

PFS = 1/40

TITULO DE INHIBICIÓN DEL SUERO = Inv PFS X no. UHA Virus

TITULO DE INHIBICIÓN DEL SUERO = 40 X 8 = 320 UIHA (unidades inhibidoras de la hemoaglutinación)

TITULO DE INHIBICIÓN DEL SUERO = 320 UIHA con glóbulos rojos de pollo lavados y concentrados al 0.75%.

## BIBLIOGRAFIA

- Bernard, J. 1988. Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. 8ª edición, tomo II. Ed. Salvat. Barcelona, España.
- Calnek, B. 1991. Enfermedades de la Aves. Ed. Manual Moderno. México, D.F.
- Cunningham, C. 1973. Virología Práctica. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Díaz, Z. y Díaz, G. 1997. Selección, Conservación y Envío de Muestras para Diagnóstico de Laboratorio. Memorias del Curso Teórico-Práctico. UNAM. México, D.F.
- Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal. Influenza Aviar. Edición especial. SAGAR
- Frappe, M. 1986. Manual de Infectología Veterinaria. 3ª edición. Ed. Francisco Méndez Oteo. México, D.F.
- <http://www.fei.es/protocolo/sero01.htm>
- <http://www.oie.int/norms/MANUAL/A>
- Kolmer, J. 1970. Diagnóstico Clínico por los Análisis de Laboratorio. 3ª edición. Ed. Interamericana. México, D.F.
- Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O. y Santos, J. 1998. Manual de Infectología Clínica. 15ª edición. Ed. Méndez. México, D.F.
- Mohanty, S. and Dutta, S. 1988. Virología Veterinaria. Ed. Panamericana. México, D.F.
- Morilla, A. y Bautista, C. 1986. Manual de Inmunología. Ed. Diana. México, D. F.
- Morilla, A. y González, V. 1997. Introducción al Diagnóstico Inmunológico de las Enfermedades de los Animales Domésticos. INIFAP- BTI- SAGAR.
- Olsen, R. G. 1983 . Inmunología e Inmunopatología de Animales Domésticos. Ed. Manual Moderno. México D.F.
- Tizard, I. 1995. Inmunología Veterinaria. 4ª edición. Ed. Interamericana, Mc Graw Hill. México, D.F.
- Valero, G. 1993. Diagnóstico Veterinario. Ed. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios A.C. México, D.F.
- Vega, D. (editor). 1995. Manual de Técnicas de Laboratorio de Prácticas de Inmunología y Virología. UNAM. México, D.F.

## 5. SEROPERFILES EN CERDOS Y SU APLICACION EN MVZ

### INTRODUCCION

Se denomina perfil serológico o seroperfiles, al muestreo de grupos de animales de diferentes edades y etapas productivas de una granja para detectar la presencia de anticuerpos. Con este método se puede determinar cuáles son los microorganismos patógenos que se encuentran en la piara, cuándo infectan a los animales, cuánto tiempo tardan en desaparecer los anticuerpos maternos, cuántos animales tiene anticuerpos inducidos por infecciones naturales o por vacunas y las posibles interacciones entre diferentes gérmenes. El objetivo de los seroperfiles es conocer el grado de infección de la población y no efectuar un diagnóstico individual.

La serología aplicada a grande escala sobre una población es un arma epidemiológica que se utiliza para estimar la prevalencia y la incidencia de una enfermedad. Un propósito importante de este tipo de pruebas es identificar entre un grupo de animales que se muestran aparentemente sanos, aquellos que tienen una alta probabilidad de adquirir la enfermedad que se está probando, a lo que se le llama inmunidad de hato. Para que con esto se tomen las medidas de control que convengan, ya sea vacunación, tratamiento o sacrificio, de acuerdo al objetivo del estudio. Por lo que la seroepidemiología es muy importante en los programas de vigilancia epidemiológica y de los programas de control o erradicación de las enfermedades que afectan una población.

Las técnicas serológicas utilizadas como pruebas tamiz en estudios epidemiológicos son diferentes de las técnicas utilizadas para el diagnóstico las cuales se consideran mas complejas, y estas se apoyan en historia clínica y la descripción del curso de la enfermedad (signos y síntomas) para establecer el diagnóstico definitivo. Aunque muchos de los aspectos de serología epidemiológica son derivados de las técnicas diagnósticas.

Por lo general se utilizan pruebas serológicas como ELISA que permite la detección de anticuerpos, o de antígenos, en el caso de algunas de las pruebas competitivas. Existen actualmente en el mercado gran número de pruebas serológicas comerciales contra los principales agentes patógenos del cerdo.

Para la detección directa de los gérmenes se ha utilizado el aislamiento o pruebas como la rotaforesis para detectar el ARN del rotavirus, o la amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, del ADN de la bacteria causante de la ileítis. La tendencia es desarrollar pruebas de alta sensibilidad y especificidad, que permitan el análisis de gran número de muestras en periodos cortos y a costos accesibles.

## Resumen de la técnica

Suero y componentes del kit a t° ambiente



Suero sospechoso en microplacas ⇔ Incubar ⇔ Lavado



Lavado ⇔ Incubar ⇔ Agregar conjugado



Agregar cromógeno



Observar resultados en espectrofotómetro

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se imprimen directamente del espectrofotómetro y se calculan en la computadora.

La presencia o ausencia del anticuerpo contra IBR se determina al calcular el cociente de muestra con respecto al control positivo débil (S/P) para cada muestra.

1. Las muestras de leche y suero con relación S/P menor que 0.250 son clasificadas como negativas para anticuerpos contra IBR.
2. Las muestras de leche y suero con relación S/P mayor o igual a 0.250 pero menor a 0.500 son considerados como sospechosos y pueden ser confirmados usando el formato de verificación.
3. Las muestras de leche y suero con relación S/P de 0.500 o mayor son considerados como positivos para anticuerpos contra IBR y no requiere verificación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, J. y Good, R. 1977. Inmunología Clínica. Ed. Salvat. Barcelona, España.
- Barret, J. 1980. Inmunología. Ed. Centro Regional de Ayuda Técnica. México, D.F.
- Bolton, D.C. 1981. Evaluation of the Critical Parameters of a Sensitive ELISA Test Using Purified Infectious Bovine Rhinotracheitis Viral Antigens. *Vet. Microbiology*, 6: 44-49.
- Carpenter, P. 1975. Inmunología y Serología. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F.
- Kit para la detección de anticuerpos contra IBR. Data on file, IDEXX Laboratories, Inc.
- Herring, A., Nettleton, P. and Burrells, C. 1980. A Micro-Enzyme-Linked Immunosorbant Assay for the Detection on Antibodies to Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *Vet. Rec.*, 8: 107-110.
- <http://www.fei.es/protocolo/sero01.htm>
- <http://www.ucd.ie/~virusref/vrjelisa.html>
- Montaraz, C. 1989. Apuntes de Inmunología Veterinaria. UNAM. México, D.F.
- Morilla, A. y Bautista, C. 1986. Manual de Inmunología. Ed. Diana. México, D. F.
- Tizard, I. 1996. Inmunología Veterinaria. 5ª edición. Ed. Interamericana, Mc Graw Hill. México, D.F.
- Rose, N., Friedman, H. and Fahey, J. 1986. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3th edition. Ed. ASM. Washington, EUA.
- Sánchez-Vizcaíno, J. y Cambra, A. 1987. Técnicas Inmunoenzimáticas ELISA en Patología Animal y Vegetal. 2ª edición. Serie técnica no. 7. UNAM. México, D.F.
- VanDonkersgoed, J. and Babiuk, L. 1991. Diagnosing and Managing the Respiratory Form of Infectious Bovine Rhinotracheitis Viral Antigens. *Vet. Microbiology*, 6: 7-12.
- Vyas, G., Stites, D. and Brecher, G. 1980. Laboratory Diagnosis of Immunologic Disorders. Ed. Grune & Stratton. EUA.
- Weiser, R., Myrvik, Q. y Pearsall, N. 1970. Inmunología. Ed. interamericana. México, D.F.
- Wyler, R. 1990. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Vulvovaginitis (BHV-1). Herpesvirus of Cattle, Horses and Pigs. Kluwer Academics Publishers. Boston.



## 4.2. PRUEBA DE INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA

### INTRODUCCION

La inmunofluorescencia es una prueba de unión primaria. El anticuerpo específico se conjuga con compuestos fluorescentes, siendo el más importante el isotiocianato de fluoresceína (FITC), sin alterar su reactividad inmunitaria, dando como resultado un trazador sensible para antígenos. El anticuerpo conjugado se añade a las células y se fija a los antígenos, se forma así un complejo inmunitario estable. El anticuerpo no fijado se elimina por lavado, y la preparación resultante se observa en un microscopio de fluorescencia contra un fondo oscuro, así se detectan los antígenos unidos al anticuerpo, por su color brillante.

Para obtener resultados óptimos, el fluorocromo seleccionado para conjugación con el antisuero debe cumplir con ciertas características:

- a) Debe absorber energía ultravioleta y emitir una cantidad casi equivalente de energía en forma de luz visible.
- b) El color de la luz emitida debe ser uno que no se encuentre habitualmente (por ejemplo, lo más diferente que sea posible de la antifluorescencia encontrada en tejidos animales).
- c) El fluorocromo debe combinarse con la molécula de anticuerpo en cantidades suficientes para producir adecuada fluorescencia, sin ocultar los sitios de anticuerpo activo.

Por lo anterior el isotiocianato de fluoresceína, es el más utilizado, ya que satisface muchos de requisitos mencionados anteriormente.

Mediante esta prueba directa se pueden identificar bacterias, principalmente cuando su número es pequeño. Por ejemplo al examinar materia fecal de animales que se supone que eliminan *Mycobacterium paratuberculosis*; cuando se examinan exudados y frotis tomados de las lesiones, para diagnosticar *Fusobacterium necrophorum*, *Listeria monocytogenes* o microorganismos del grupo de los clostridios. También se utiliza para detectar virus, como el virus de la rabia y el de la leucemia felina.

La utilidad de la inmunofluorescencia para identificar el antígeno de la rabia en tejidos de animales infectados naturalmente fue demostrada alrededor de los años sesenta, y después adoptaron el método para el diagnóstico de rutina de la rabia en los laboratorios de salud pública.

El método directo en el cual un anticuerpo específico para la rabia se conjuga con un fluorocromo, se emplea para buscar antígeno de la rabia en el cerebro, las glándulas salivales u otros tejidos. El método indirecto se usa para descubrir anticuerpos de la rabia: en esta modificación, un antisuero contra las globulinas del suero de la especie (gatos por ejemplo) que está siendo estudiada se conjuga

con el fluorocromo y se aplica al complejo antígeno rábico-anticuerpo para localizar los sitios de fijación de los anticuerpos. La prueba directa de inmunofluorescencia (IF) se recomienda para el examen diagnóstico del antígeno de la rabia en muestras de tejido ya que el número limitado de pasos reduce la posibilidad de un error técnico y hay también menos probabilidad de encontrar inoportunas reacciones no rábicas antígeno-anticuerpo.

## DESARROLLO DE LA PRUEBA

### MATERIAL

- Portaobjetos
- Pinzas, tijeras y abatelenguas
- Lápiz graso
- Acetona y cubeta de fijación
- Pipeta serológica de 1 ml graduada 1/100
- Caja de petri y toalla de papel para incubación en cámara húmeda
- Estufa ajustada a 37°C
- Microscopio de fluorescencia
- Muestra para diagnóstico (sospechosa)
- Muestra de control positivo
- Conjugado contra el antígeno

### MUESTRA PARA EL DIAGNOSTICO

Para muestra de diagnóstico se puede utilizar una porción de órgano o bien su macerado, así como fluidos corporales o cultivos celulares infectados para determinar la presencia de antígeno.

La elección del órgano a estudiar así como de la parte más indicada de éste, dependerá de la enfermedad que se pretenda diagnosticar (cuadro 11).

Cuadro 11. Tipo de muestra de acuerdo a la enfermedad

Enfermedad a diagnosticar	Organo a elegir
Rabia	Cerebro
Moquillo	Impronta de córnea, sangre con anticoagulante
Fiebre porcina clásica	Tonsilas, ganglios linfáticos, bazo

### MUESTRA DE CONTROL POSITIVO

Para muestra de control positivo, se utiliza tejido reconocido como positivo a la misma enfermedad que se pretende diagnosticar.

### CONJUGADO

El conjugado se elabora con un antisuero (suero rico en anticuerpos contra un antígeno determinado) se purifican los anticuerpos y se les agrega un fluorocromo, en este momento, ya es conjugado.

Este conjugado se lava por diálisis para eliminar el excedente de fluorocromo.

## Consideraciones sobre la técnica

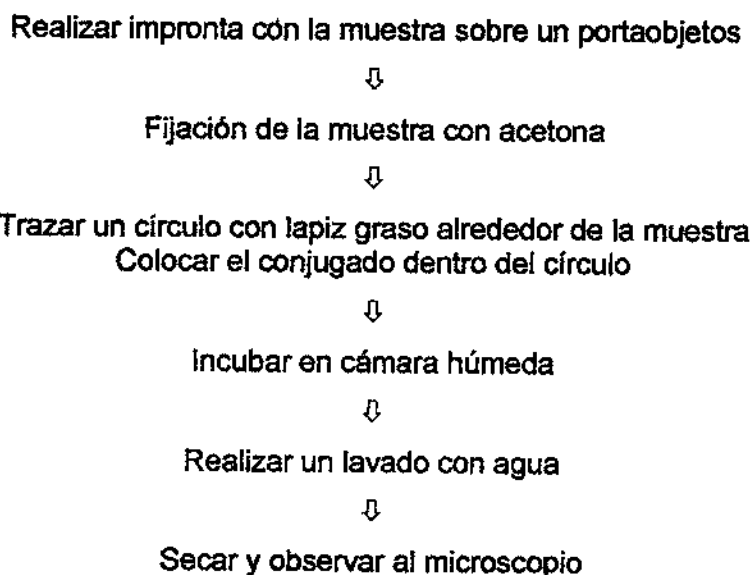
- Los frotis o impresiones de tejidos que se van a teñir deben ser delgados, ya que las preparaciones gruesas absorben conjugado que después no es posible enjuagar eficazmente. El tejido fresco es el mejor material para hacer frotis, pero también pueden hacerse preparaciones con tejidos congelados o glicerizados, o hasta con sedimento de suspensiones. Los tejidos glicerizados no se adhieren bien a los portaobjetos por lo que los tejidos se deben enjuagar adecuadamente en solución salina para eliminar el exceso de glicerina.
- El virus de la rabia se encuentra distribuido de manera irregular en el cerebro; por lo tanto, se deberá seleccionar tejido de varias áreas del cerebro para su examen.
- Para preparar tejidos de glándula salival, se seca el tejido para eliminar el exceso de material mucoso, desmenuzándolo y después machacando los fragmentos sobre el portaobjetos.
- Los frotis, impresiones o cortes se dejan secar al aire y después se fijan antes de teñirlos con conjugado. La fijación aumenta la permeabilidad de los tejidos y permite el máximo contacto entre el antígeno rábico intracelular y el antisuero conjugado. Se puede fijar con acetona entre  $-20^{\circ}$  y  $-5^{\circ}\text{C}$  durante una a cuatro horas con buenos resultados, aunque también se pueden usar alcohol etílico o etanol, pero son menos eficaces.
- Después de la fijación, las preparaciones se secan al aire y quedan listas para su tinción.
- En cada laminilla se tiñen dos frotis idénticos de la muestra estudiada, uno con conjugado mezclado con partes iguales de cerebro de ratón infectado con rabia al 20% en diluyente, y el otro conjugado mezclado con partes iguales de cerebro de ratón normal al 20% de diluyente.

## METODO

1. Cortar con la ayuda de pinzas y tijeras una porción de la muestra para diagnóstico y depositarla sobre el abatelenguas.
2. Hacer un frotis de la muestra para diagnóstico sobre un portaobjetos y marcarla con el lápiz grueso con la letra A.
3. Siguiendo el mismo método, hacer una impronta de la muestra de control positivo y marcarla con el lápiz grueso con la letra B.
4. Sumergir el portaobjetos en acetona (fijador) durante 30 minutos.
5. Sacar el portaobjetos y dejarlo secar al aire.
6. Con el lápiz grueso, trazar un círculo alrededor de cada impronta para "contener" el conjugado.

7. Con una pipeta, llenar cada círculo con el conjugado.
  8. Humedecer una toalla de papel y depositarla doblada en el fondo de una caja de petri para utilizarla como cámara húmeda. Depositar sobre la toalla el portaobjetos, cuidando de no derramar el conjugado y tapar la caja.
  9. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
  10. Sacar el portaobjetos de la cámara húmeda y lavarlo con agua corriente durante 1 minuto.
  11. Secar al aire y observar al microscopio de luz ultravioleta (microscopio de fluorescencia).
- Debido a que la rabia es una enfermedad zoonótica se requiere hacer uso de buenas prácticas de bioseguridad al manejar las muestras para evitar infecciones hacia el hombre. Entre otras prácticas de trabajo se debe manipular de forma cuidadosa los órganos que se utilicen para el diagnóstico, evitar pinchaduras, usar equipo de protección personal, realizar una asepsia general tanto en la persona como en las superficies de trabajo, no comer, fumar o beber durante la práctica, etc.

### **Resumen de la técnica**



### **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

- Un resultado positivo se fundamenta en la presencia de inclusiones fluorescentes de color verde o amarillo verdoso nítidamente brillantes, de formas diversas y tamaños variables.

En el citoplasma de células infectadas se observan acumulaciones de antígeno rábico, cuya forma y tamaño varían. El cuerpo de Negri se identifica fácilmente por

su forma oval o redonda y los contornos lisos. La periferia de estos cuerpos con frecuencia fluoresce con mayor intensidad que las porciones internas.

El antígeno de la rabia también se observa como largas masas fluorescentes, de forma irregular, y como pequeños gránulos similares a polvo. Este material granular debe ser bien diferenciado de la tinción precipitada, que posee aspecto cristalino, tiene una fluorescencia brillante y con frecuencia contornos irregulares.

El antígeno de la rabia en el tejido de la glándula salival se observa como pequeñas masas, más irregulares que las observadas en el tejido cerebral; es muy común observar antígeno pulverizado.

El examen debe comenzar con la laminilla de control positiva para la rabia. El frotis teñido con la muestra normal mostrará masa brillantemente fluorescentes de antígeno verde manzana; y el frotis teñido con la muestra infectada con rabia no debe mostrar fluorescencia o sólo fluorescencia de escasa intensidad. Si los frotis positivos de control resultan satisfactorios, deben examinarse enseguida los frotis de control negativos para la rabia.

Se examinará primero el frotis del tejido teñido con conjugado mezclado con cerebro normal de ratón. Los resultados se interpretarán de la siguiente manera:

- Si no se observa material fluorescente específico, la muestra se considera negativa para el antígeno de la rabia.
- Si se encuentran masas fluorescentes típicas de acumulaciones de antígeno rábico, se deberá examinar el frotis adyacente (el frotis con muestra infectada).
- Si hay fluorescencia típica (inhibida) en esta preparación, se considera que la muestra es positiva para el antígeno de la rabia.
- Si se observa fluorescencia sobre el frotis "inhibido", los resultados de la prueba se consideran inespecíficos, y deberá repetirse la prueba

Los tejidos animales normalmente fluorescen de color azul pálido. Se pueden encontrar otros colores fluorescentes, como el rojo brillante del pigmento ceroide, o el azul brillante de los cristales de sales como el cloruro de sodio.



## BIBLIOGRAFIA

- Alexander, J. y Good, R. 1977. Inmunología Clínica. Ed. Salvat. Barcelona, España.
- Baer, G. 1982. Rabia. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F.
- Bellanti, J. A. 1986. Inmunología. 3ª edición. Ed. Interamericana. México, D. F.
- Carpenter, P. 1975. Inmunología y Serología. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F.
- Cunningham, C. 1973. Virología Práctica. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Díaz, Z. y Díaz, G. 1997. Selección, Conservación y Envío de Muestras para Diagnóstico de Laboratorio. Memorias del Curso Teórico-Práctico. UNAM. México, D.F.
- <http://www.fei.es/protocolo/sero01.htm>
- <http://www.oie.int/norms/MANUAL/A>
- <http://www.ucd.ie/~virusref/vrlelisa.html>
- Olsen, R. G. 1983 . Inmunología e Inmunopatología de Animales Domésticos. Ed. Manual Moderno. México D.F.
- Outteridge, P. 1988. Veterinary Immunology. Ed. Academic Press. E.U.A.
- Tizard, I. 1995. Inmunología Veterinaria. 4ª edición. Ed. Interamericana, Mc Graw Hill. México, D.F.
- Vega, D. (editor). 1995. Manual de Técnicas de Laboratorio de Prácticas de Inmunología y Virología. UNAM. México, D.F.

### 4.3. PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN

#### INTRODUCCION

Las reacciones de aglutinación y precipitación son la base de muchas técnicas en el laboratorio de inmunología. A diferencia de las reacciones de precipitación que se pueden cuantificar y son fáciles de llevar a cabo, las técnicas de aglutinación sólo son semicuantitativas y un poco más complicadas. Las ventajas importantes de las reacciones de aglutinación son su grado mayor de sensibilidad y que permiten valorar los puntos finales visualmente.

Los anticuerpos establecen uniones cruzadas con los antígenos que se presenten en forma de partículas, y esto se hace que se agrupen o que se aglutinen. Esta aglutinación se logra mezclando una suspensión de partículas antigénicas, por ejemplo, bacterias con antisuero. Los anticuerpos se combinan con rapidez con las partículas (unión primaria), pero la aglutinación es mucho más lento, ya que la adherencia entre las partículas sólo se produce cuando se tocan unas con otras.

Normalmente las suspensiones son estables y se evita que sus partículas se agrupen por una carga negativa que existe en su superficie, la cual es denominada "potencial zeta". Sin embargo, las inmunoglobulinas tienen cargas positivas y, cuando cubren a las partículas, neutralizan este potencial zeta y como consecuencia sucede la aglutinación.

Las reacciones de aglutinación se pueden clasificar como directas o indirectas (pasivas). En la técnica directa, una célula o antígeno particulado insoluble se aglutina de manera directa por el anticuerpo. Un ejemplo es la aglutinación de eritrocitos A por antisuero anti-A. La aglutinación indirecta o pasiva se refiere a la aglutinación de células recubiertas de antígeno, o partículas inertes que son portadores pasivos de antígenos que, de otra manera, serían solubles.

Las pruebas inmunológicas de este tipo tienen un valor diagnóstico retrospectivo, debido a que las aglutininas específicas sólo aparecen en la sangre algún tiempo después del establecimiento de la infección. En Medicina Veterinaria el fenómeno de la aglutinación ha tenido su mayor aplicación para descubrir la presencia de aglutininas de la *Brucella abortus* en el suero sanguíneo, leche, suero de leche, mucosa vaginal y plasma seminal del ganado bovino. Para realizar este tipo de pruebas se pueden utilizar tanto aglutinación en tubos como placas.

La técnica nos va a permitir:

a) Conociendo el suero, identificar antígenos. Existe la posibilidad de identificar o clasificar distintas clases de bacterias u hongos, así como conocer los grupos sanguíneos eritrocíticos.

b) Conociendo un antígeno, determinar la presencia de anticuerpos.

La brucelosis es una enfermedad infecciosa, bacteriana, contagiosa, de curso agudo y crónico, producida por diversas especies del género *Brucella*, que afecta



a varias especies de animales domésticos, silvestres y al hombre, por lo que es de gran importancia para el país, ya que es una de las principales zoonosis.

Las principales cepas de Brucela que afectan a los animales domésticos y al hombre son: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. bovis*, *B. suis*, *B. neotomae*.

Para el diagnóstico de Brucella se cuenta con las siguientes pruebas (cuadro 12):

Cuadro 12. Pruebas para el Diagnóstico de Brucella

Prueba de hato	Pruebas individuales	
	Pruebas de rutina	Pruebas complementarias
Anillo en leche (Bang)	Rápida en placa (Huddleson)	Tarjeta ácida
	Lenta en tubo	Mercapto-etanol
		Rivanol
		Fijación de complemento (no es prueba de aglutinación)
		Coombs

En las pruebas de aglutinación, los determinantes antigénicos donde se fijan los anticuerpos, reciben el nombre de aglutinógenos y los anticuerpos de aglutininas.

En los casos que se utilice la vacunación, es muy importante seguir las indicaciones de los fabricantes con respecto al número de vacunas y edades de vacunación ya que de lo contrario, sería difícil determinar si los títulos de un animal corresponden realmente a animales enfermos.

También es importante estandarizar los resultados, ya que con pequeñas diferencias en la elaboración de los antígenos, es común encontrar diferentes resultados del mismo suero, de un laboratorio a otro.

## INTERPRETACION DE RESULTADOS

La interpretación de las pruebas serológicas de Huddleson y lenta en tubo, se realiza en base a la comparación de los resultados de la prueba con el siguiente cuadro 13.

Cuadro 13. Interpretación de resultados de la prueba de Huddleson y lenta en tubo.

ESPECIE	1/25	1/50	1/100	1/200
Bovinos no vacunados	-	?	+	+
Bovinos vacunados (a)	-	-	?	+
Ovinos (b)	-	+40 UI	+	+
Caprinos (c)	-	?	+	+
Porcinos	-	?	+	+
Equinos	-	-	+	+
Caninos (d)	+	+	+	+

(-) Los sueros que aglutinan en este título, se consideran NEGATIVOS.

(?) Los sueros que presentan la última aglutinación es este título se consideran SOSPECHOSOS. Y se recomienda repetir la prueba 60 días después.

(+) Los sueros que presentan la última aglutinación en este título se consideran POSITIVOS

(a) En la Comunidad Económica Europea los animales con 30 UI o más se consideran POSITIVOS.

(b) Se debe tomar en cuenta que muchos ovinos no reaccionan a ninguna prueba serológica por lo que se debe recurrir a una prueba de Commbs, considerándose POSITIVOS los títulos de 1/40 o superiores, sin embargo en esta especie es preferible utilizar la prueba de Fijación de Complemento.

(c) La interpretación de resultados en caprinos es dudosa en animales vacunados con Rev. 1 o H 38.

(d) En esta especie es preferible utilizar la prueba de Fijación de Complemento.

A continuación se describen las técnicas de las diferentes tipos de pruebas de aglutinación.

### 4.3.1. PRUEBA DE ANILLO EN LECHE

#### MATERIAL

- Gradilla
- Tubo de ensaye
- Pipeta serológica de 1 ml graduada 1/100
- Leche "bronca"
- Antígeno de Bang (este antígeno es elaborado con *B. abortus* cepa 1119-3, a una concentración del 4% y teñida con hematoxilina o rojo de tetrazolio).
- Baño María



## METODO

1. La leche y el antígeno deben estar a temperatura ambiente.
2. Con una pipeta depositar en el tubo de ensaye 1 ml de leche.
3. Agregar a la leche del tubo una gota (0.03 ml) de antígeno de Bang.
4. Mezclar el contenido del tubo sosteniéndolo con dos dedos cerca de la boca del mismo y golpeando con otro dedo el fondo del tubo (el tubo no debe agitarse).
5. Incubar preferentemente a 37°C durante 1 hora (no mover).

## INTERPRETACION DE RESULTADOS

- El resultado es **POSITIVO** a la prueba de Bang, si el anillo de nata que se forma en la superficie de la leche del tubo, se ve teñido del mismo color del antígeno y el resto de la leche se observa blanca.
- El resultado es **NEGATIVO** a la prueba, si el anillo de nata que se forma en la superficie de la leche del tubo se ve blanco y el resto de la leche se observa del mismo color que el antígeno. También es negativo si el anillo de nata y la leche están teñidos.

Cuando se utiliza leche de cabra, la grasa puede flotar, quedar suspendida o depositarse en el fondo del tubo, sin embargo la interpretación de los resultados en base a la coloración del anillo de grasa y la leche es la misma.

### 4.3.2. PRUEBA RAPIDA EN PLACA (HUDDLESON)

Esta prueba detecta la presencia de anticuerpos contra Brucela en el suero.

#### MATERIAL

- Portaobjetos.
- Pipeta serológica (automática)
- Fuente de luz (preferible con fondo negro)
- Palillos
- Frasco con suero de bovino sospechoso a Brucela
- Antígeno de Huddleson

#### METODO

1. El antígeno y el suero deben estar a temperatura ambiente.
2. Con la pipeta tomar 0.25 ml del suero, cuidando que no queden burbujas en el interior de la pipeta y que no queden gotas de suero en la punta de la pipeta.



3. Apoyando la punta de la pipeta sobre el portaobjetos e inclinándolo a 45°, depositar cuidadosamente los siguientes volúmenes del suero sospechoso a brucelosis. 0.08 ml, 0.04 ml, 0.02 ml, 0.01 ml; dejando aproximadamente 5 cm entre cada muestra de suero (depositar el suero de izquierda a derecha).
4. Con un gotero ajustado a 0.03 ml depositar una gota de antígeno de Huddleson a cada una de las muestras de suero
5. Con la punta de un palillo mezclar por separado cada una de las muestras de suero con antígeno.
6. Ya mezcladas las muestras, aplicar un movimiento helicoidal a la placa de vidrio, cuidando que las muestras no se mezclen entre sí, y esperar 8 minutos para hacer la lectura.

#### Resumen de la técnica (cuadro 14)

Cuadro 14. Resumen del método de Huddleson

Suero (ml)	0.08	0.04	0.02	0.01
Antígeno (gotas)	1	1	1	1
Título correspondiente	1/25	1/50	1/100	1/200

#### INTERPRETACION DE RESULTADOS

Se considera aglutinación, a las mezclas que presentan conglomerados o grumos a los 8 minutos, en caso de no haber cambios, se considera que no hay aglutinación. Se debe tener en cuenta que el encontrar aglutinación en una o varias mezclas, no necesariamente indica que el animal esté positivo a brucela, es necesario comparar los resultados con los del cuadro 13.

#### 4.3.3. PRUEBA EN TARJETA

Esta prueba también es conocida como prueba de tarjeta ácida o prueba ácida.

#### MATERIAL

- Portaobjetos
- Pipeta de 1 ml
- Palillo
- Frasco con suero de bovino sospechoso a brucela, a temperatura ambiente.
- Antígeno para prueba de tarjeta, a temperatura ambiente (este antígeno se prepara con *B. abortus* cepa 1119-3 a una concentración del 8%, teñido con rosa de bengala y un pH de 3.65).
- Aglutinoscopio

## METODO

1. Con la pipeta tomar 0.03 ml de suero para depositar sobre la placa de vidrio evitando que la punta de la pipeta toque la placa de vidrio.
2. Agregar 0.03 ml de antígeno de tarjeta al lado de la gota de suero depositado en la placa (imagen 32).

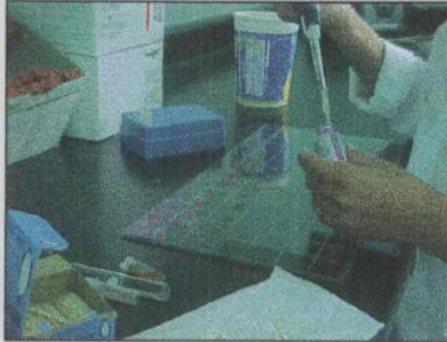


Imagen 32. Placa con reactivos, una gota de suero problema y una de antígeno

3. Mezclar con el palillo procurando formar un círculo de aproximadamente 2 cm de diámetro (imagen 33).



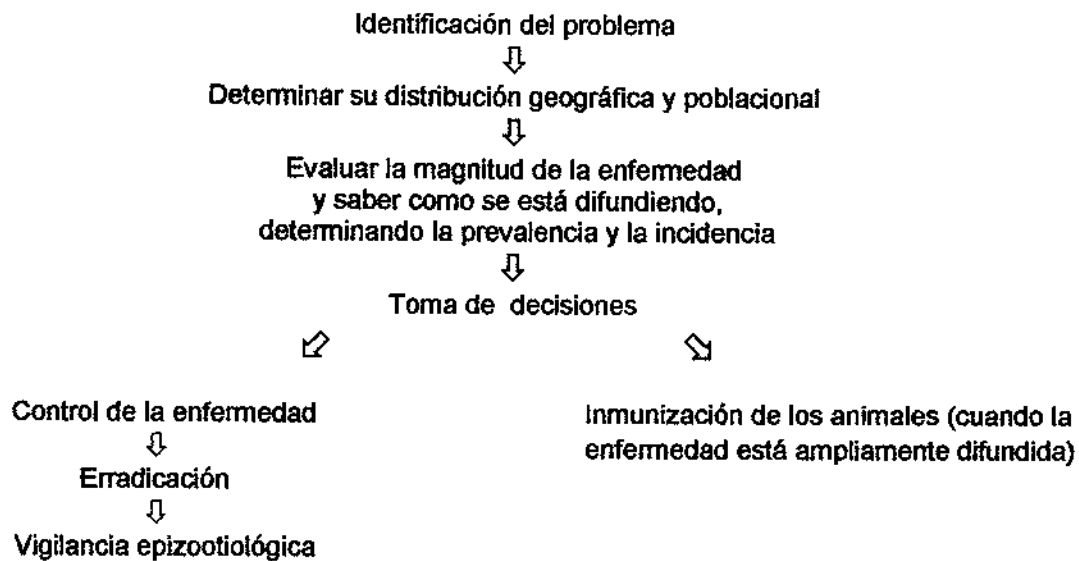
Imagen 33. Mezclando suero y el antígeno

4. Mover la placa con movimiento helicoidal y leer los resultados en 4 minutos en el aglutinoscopio (imagen 34).



Imagen 34. Lectura de resultados

De acuerdo a los objetivos arriba mencionados, se observa que la secuencia adecuada al realizar un estudio serológico es:



Las medidas zootécnicas de manejo aplicadas sobre las poblaciones animales, con frecuencia alteran la proporción de animales resistentes en un hato, dando como resultado la presentación de brotes de enfermedad con características cíclicas. Entre estas prácticas de manejo, se pueden mencionar:

- La introducción de animales susceptibles en una población con relativa inmunidad de hato, ya sea por nacimientos o por reemplazos.
- Frecuencia en los tratamientos de desparasitación
- Efectividad de los baños garrapaticidas
- Fallas en los sistemas de vacunación, etc.

Los perfiles tienen limitaciones ya que no hay pruebas de diagnóstico para todas las enfermedades o las que hay disponibles, permiten analizar un número limitado de muestras, el costo puede ser muy elevado y en cada prueba varía la sensibilidad y la especificidad.

### **Muestreo**

Debido a que no es posible ni práctico muestrear a toda la población en un estudio serológico, es necesario tomar un número representativo de muestras de una población.

#### **- Métodos de muestreo**

- a) Muestreo simple al azar, en el cual se seleccionan individuos de una población de tal manera que cada miembro de la población tiene la misma probabilidad de ser seleccionado en la muestra, con lo que se evita posibles favoritismos.



- b) Muestreo estratificado al azar. Este tipo de muestreo es utilizado cuando en una población existen grupos de individuos que varían, formando diferentes estratos. En este método la población es dividida en grupos relevantes o estratos (especie, raza, sexo, edad, función zootécnica, etc.). La ventaja de este sistema es que asegura que la muestra contiene individuos que son representativos de cada uno de los estratos que componen la población, por lo que el error del muestreo es menor comparado con el que se obtendría con un muestreo simple al azar.
- c) Muestreo por etapas. Este procedimiento es útil cuando se planea realizar un estudio serológico en un área determinada y se requiere tomar una muestra que represente a la población animal localizada en esa área.

Para estudios de seroperfiles en cerdos se utiliza el muestreo estratificado por edades y etapa productiva, al azar; considerando las siguientes etapas:

1. Lactancia: animales de hasta 5 semanas de edad.
2. Crecimiento: animales de 6 hasta 13 semanas de edad.
3. Engorda: animales de 14 hasta 26 semanas de edad.
4. Pie de cría: hembras de reemplazo, y de uno hasta 6 o más partos.

Se recomienda para el muestreo sangrar animales de diferentes grupos con intervalo de dos, tres o cuatro semanas de edad. Se deben sangrar como mínimo 10 animales por grupo de edad o etapa productiva.

### **Interpretación de los resultados**

- Los resultados de los seroperfiles deben estar de acuerdo con el sistema de producción. Por ejemplo, si se trata de granjas de uno, dos sitios o tres sitios.
- Se deben tomar en cuenta los resultados anteriores, las observaciones clínicas, de rastro, necropsias, diagnósticos de laboratorio y parámetros de producción.
- Las características de cada prueba y la clase de información que proporciona. Por ejemplo; ELISA competitivo gl no detecta anticuerpos vacunales inducidos por una vacuna gl contra el virus de Aujeszky, solo los inducidos por el virus de campo, en cambio ELISA indirecto o suero neutralización detecta anticuerpos inducidos por cepas vacunales y de campo.
- Los resultados deben ser interpretados de acuerdo con las características de la infección; hay gérmenes muy infecciosos de baja virulencia (virus de Aujeszky) y un gran número de animales desarrollan anticuerpos, en cambio otros tienen baja infecciosidad pero pueden ser muy virulentos en ciertas condiciones (*A. pleuropneumoniae*) y son pocos los animales que desarrollan anticuerpos, pero hay animales enfermos.

- Se debe conocer el tipo de respuesta serológica que induce cada germen y el tiempo en que tardan en aparecer o desaparecer los anticuerpos; en el caso de la micoplasmosis, los cerdos tardan hasta un mes y medio en desarrollar los anticuerpos, y en cerdos infectados con el Paramyxovirus del Ojo Azul o virus de PRRS, los anticuerpos desaparecen en pocos meses después de la infección.
- Las posibles interacciones entre los gérmenes.
- La zona geográfica en donde se encuentre la granja.
- El patrón de anticuerpos que se observa en las hembras de cría debe ser semejante al de los cerdos de dos y cuatro semanas de edad, sobretodo en las infecciones virales.
- Los microorganismos de las madres son los que infectan a sus lechones, aunque estén protegidos con la inmunidad materna. Cuando los cerdos la pierden y se tornan susceptibles, los gérmenes que se encuentran en algunos de estos cerdos portadores, se multiplican. Este periodo sería la fase de amplificación de los gérmenes y la proporción sería de 8 a 10 veces mayor multiplicación en los cerdos de la línea, con relación a cada hembra de cría.
- Para determinar la importancia de los gérmenes patógenos de la granja, es necesario contar con los seroperfiles de cada uno de ellos y poder determinar cuál es su papel, cuáles son agentes primarios e inmunosupresores y cuáles estarían actuando como secundarios. No se recomienda efectuar el seroperfil con solo un germen, ya que la información que se obtiene es muy limitada y sería muy difícil determinar cuál es su papel; por ejemplo sólo el *A. pleuroneumoniae* en un problema respiratorio o el del Parvovirus en uno reproductivo, respectivamente. Esto no aplica cuando sólo se quiere determinar si la granja está infectada con un microorganismo, por ejemplo con el virus de la enfermedad de Aujeszky.
- Los agentes primarios que pueden causar la enfermedad por sí solos o inducir inmunosupresión (cuadro 19), para que se desarrollen los gérmenes secundarios, son los siguientes:
  - Virus de la Fiebre Porcina Clásica (FPC).
  - Virus de la Enfermedad de Aujeszky (EA).
  - Virus de Síndrome Disgénésico y Respiratorio del Cerdo (PRRS).
  - Virus de la Influenza Porcina (IP).
  - Paramyxovirus Porcino de la Enfermedad de Ojo Azul (EOA)
  - *Mycoplasma hyopneumoniae* (MH).
  - *Salmonella cholerasuis* (SC).



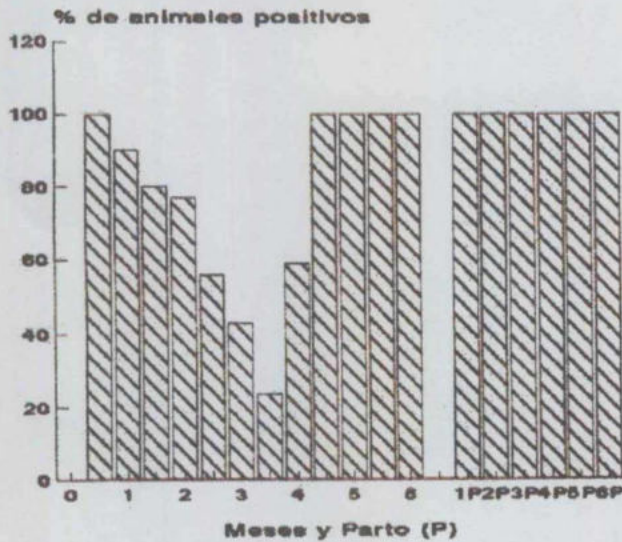
agente secundario involucrado. La mayoría de los cerdos se inmunizan en forma natural y al no haber animales susceptibles el virus deja de circular.

El siguiente periodo es cuando los animales empiezan a perder los anticuerpos maternos y se infectan con el virus. En esta etapa el virus se multiplica en la granja; además, cada vez que ocurre, los animales pueden manifestar signos clínicos respiratorios. Los cerdos infectados quedan portadores del virus durante toda su vida productiva. El virus se mantiene en la granja por medio de las hembras de reemplazo infectadas.

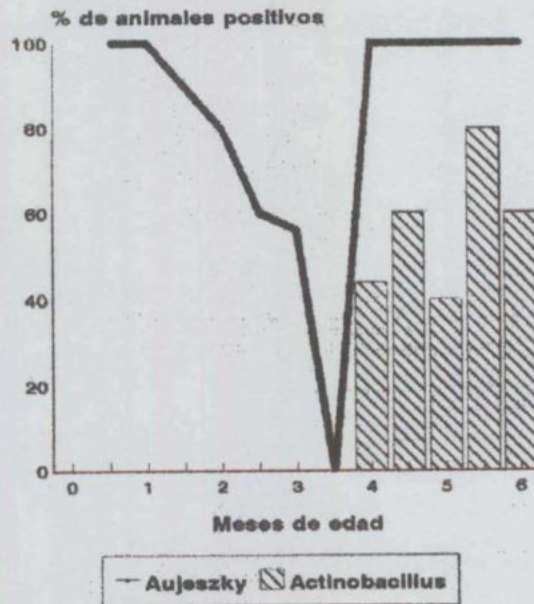
#### Análisis del seroperfil

1. Con el muestreo de más de 100 animales se puede detectar a un animal infectado con 95% de confianza cuando la prevalencia es entre 2% al 3%, dependiendo del número de animales en la granja. Sin embargo si el seroperfil es negativo no se puede asegurar que no existan animales infectados.
2. Con el resultado del porcentaje de las hembras de cría seropositivas, se puede estimar la prevalencia aproximada, y decidir las técnicas para controlar la EA. Si la prevalencia es muy elevada, como en el ejemplo que se presenta en la gráfica 2, se deben tomar medidas para reducirla, o si es muy baja, se podría tratar de erradicar la enfermedad de la granja.
3. Para conocer la prevalencia real se deben muestrear a todos los animales de pie de cría y sementales.
4. Con los resultados de los cerdos de desarrollo y engorda se puede determinar si el virus de la EA se está multiplicando en este grupo de animales (ver gráfica 1). Esta parte del ciclo del virus de la EA es la más importante, ya que es cuando el virus se multiplica en la granja y se puede manifestar como un brote de pleuroneumonía por *A. pleuroneumoniae* o neumonía por *P. multocida*.
5. Esto se puede corroborar si se realiza un seroperfil para APP y se comparan los resultados (gráfica 2).
6. Se puede determinar si existe una relación directa entre la seroprevalencia en las hembras de cría y la infección en los cerdos jóvenes (gráfica 1).
7. Se puede determinar la curva de desaparición de los anticuerpos maternos y conocer cuál es el mejor momento para vacunar a los cerdos, sin que se bloquee la vacuna. En este caso el momento más adecuado sería a las 10 semanas y repetir la vacunación a las 14 (gráfica 1).
8. Es posible evaluar la respuesta a la vacuna, si la seroprevalencia de virus de campo es muy baja y los sueros se prueban con ELISA indirecta.
9. En caso de que se hayan instrumentado medidas de control, el seroperfil se debe repetir cada 6 meses, para dar seguimiento a los avances que se hayan logrado en la reducción de la seroprevalencia.





Gráfica 1. Perfil serológico de EA. Prueba de ELISA competitiva gl.



Gráfica 2. Perfil serológico de EA y *A. pleuroneumoniae*.

## FIEBRE PORCINA CLÁSICA (FPC)

### Características

Debido a que en varias zonas del país todos los animales son inmunizados, por lo general se obtienen porcentajes de seropositividad superiores al 70%, que se consideran adecuados para estar protegidos en caso de un brote. Mientras en granjas donde no se vacuna, se ha observado algunas veces que las infecciones

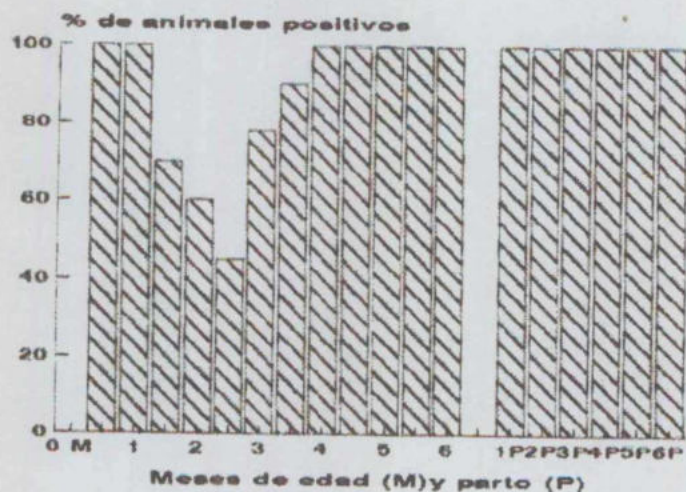
de animales susceptibles con virus de campo de baja o mediana patogenicidad, no se manifiestan en forma explosiva, sino como un incremento de morbilidad y mortalidad en algunos grupos de animales; sin embargo, gran número de cerdos desarrollan anticuerpos debido a la rápida difusión del virus. Por lo anterior, la serología es muy útil para detectar infecciones por el virus del FPC, en granjas donde los animales no son vacunados.

Las pruebas de laboratorio utilizadas para estudiar los perfiles serológicos de FPC son:

- Seroneutralización
- ELISA

#### Análisis del seroperfil

1. La vacunación debe inducir anticuerpos en más del 70% de los animales de desarrollo y engorda, dos meses después de haber sido vacunados, y en más del 80% de las hembras de cría (gráfica 3). Las cerdas se vacunan al destete y los lechones a las 7 semanas de edad.
2. Los anticuerpos maternos deben tener vida media de un mes.
3. En granjas donde no se vacuna o que se encuentran en zonas libres de FPC, todos los sueros deben ser negativos.
4. Si se vacuna a las madres y no a los lechones, el virus vacunal puede llegar a infectarlos y algunos de éstos llegan a desarrollar anticuerpos.



Gráfica 3. Perfil serológico de animales vacunados contra FPC. Prueba de ELISA



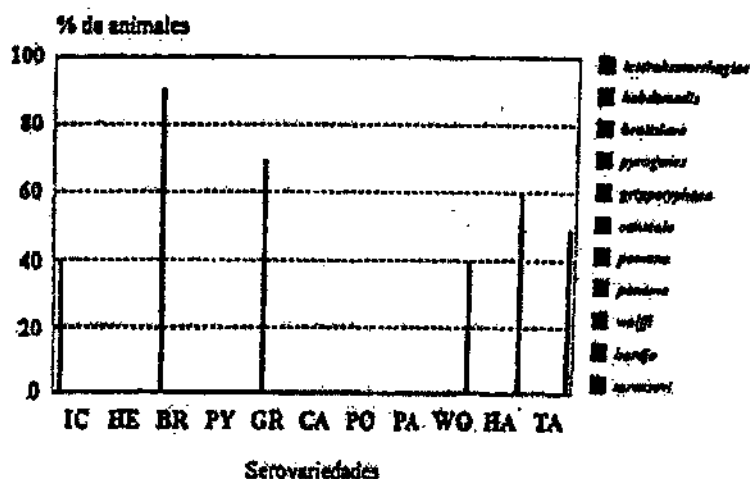
## LEPTOSPIROSIS (*Leptospira interrogans*)

### Características

Las leptospiras entran a la granja a través de cerdos portadores, que las excretan en la orina contaminando el medio ambiente. Los cerdos se infectan a través de las mucosas y solo muestran signos clínicos las hembras gestantes susceptibles. La prueba de laboratorio que se utiliza para la detección de la leptospirosis es la microaglutinación.

### Análisis del seroperfil

1. Se deben obtener sueros de hembras de cría de más de 3 partos o sementales, que son los que han tenido mayor oportunidad de infectarse en el transcurso de su vida.
2. Se tienen que muestrear como mínimo 10 animales para determinar las serovariedades que se encuentran en la granja. Se considera importante una serovariedad si se encuentran anticuerpos en más del 30% de los animales (gráfica 4).
3. Títulos del suero entre 1:100 a 1:400 son indicativos de que los animales sufrieron una infección. Títulos de 1:800 o más sugiere que ocurrió un brote.
4. Para demostrar que hubo un brote, se deben tomar muestras pareadas con un mes de intervalo, y demostrar que hubo incremento de por lo menos 5 diluciones en el título.
5. El muestreo sirve para determinar contra que serovariedades se debe vacunar a los animales.
6. Se considera que los animales seropositivos son portadores y están excretando leptospiras.
7. Las bacterinas rara vez inducen títulos de anticuerpos mayores de 1:20, pero son protectores. Si se consideran positivos títulos mayores de 1:100 entonces la prueba no detecta anticuerpos inducidos por las bacterinas.



Gráfica 4. Frecuencia de hembras de cría con anticuerpos

contra *Leptospira interrogans*. Prueba: aglutinación microscópica  
OJO AZUL (*Paramixovirus porcino del ojo azul*)

### Características

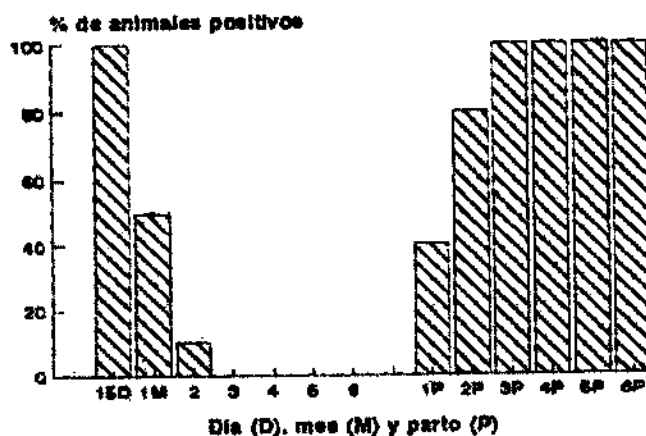
El virus del ojo azul (POA) provoca una enfermedad caracterizada por mortalidad de lechones con signos nerviosos, por lo que se confunde con la enfermedad de Aujeszky; además puede haber disminución de la fertilidad y abortos en las hembras, mortinatos, lechones nacidos débiles, en los sementales puede presentarse orquitis unilateral y aspermia. Algunos animales desarrollan opacidad unilateral de la córnea. Probablemente el virus se mantiene en la granja durante largos periodos a través de la infección de los animales en forma subclínica.

Las pruebas de laboratorio utilizadas para esta enfermedad son:

- Seroneutralización
- Inhibición de la hemaglutinación

### Análisis del seroperfil

1. El seroperfil puede mostrar que animales de todas las edades y las hembras de cría tienen anticuerpos o en ocasiones estos se encuentran sólo en los cerdos de desarrollo y engorda (gráfica 5).
2. En la mayoría de las granjas en las que los animales tienen anticuerpos no se observan signos clínicos. También ocurre lo contrario, que hay sementales con orquitis unilateral, aspermia y cerdos de diferentes edades con opacidad corneal, pero son seronegativos.
3. Para el diagnóstico diferencial se debe comparar el seroperfil de POA con el de EA, PRSS y parvovirus. Se ha sugerido que el virus de POA es un agente secundario que aparece como consecuencia de la infección por el virus de PRRS.



Gráfica 5. Perfil serológico del Paramyxovirus porcino de ojo azul. Prueba IH. Se consideró positivo a un suero de 1:24 en adelante.



## PARVOVIRUS

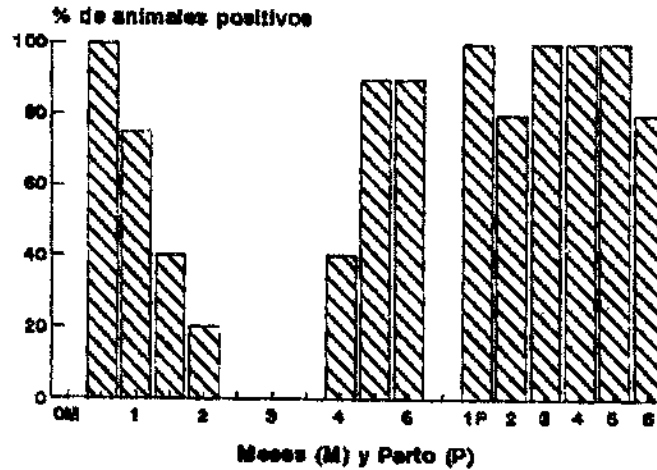
### Características

El parvovirus infecta a los cerdos de casi todas las granjas porcinas. La infección ocurre en el tracto gastrointestinal y es inocua, excepto para las hembras gestantes que no tengan anticuerpos circulantes; en este caso el virus infecta al feto, éste muere y se momifica.

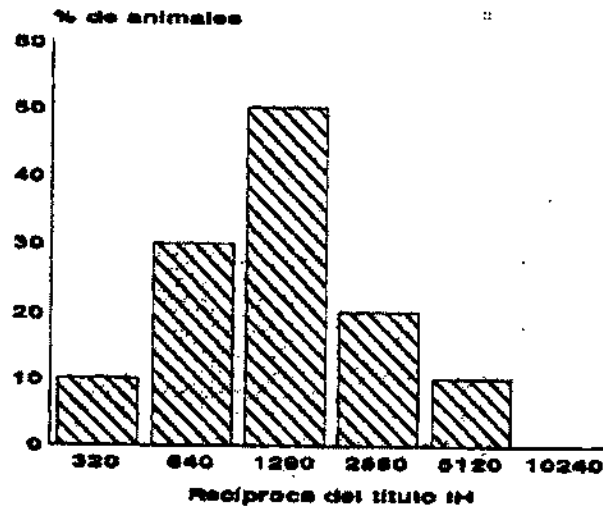
La prueba serológica para el diagnóstico de parvovirus es Inhibición de la hemaglutinación.

### Análisis del seroperfil

1. Se debe tener más del 70% de las hembras de reemplazo, primero y segundo parto con anticuerpos y por lo menos el 80% del resto de las hembras adultas. (gráfica 6). Con esta seroprevalencia no es necesario vacunar a los animales e indica que estos últimos se están infectando en forma natural.
2. Cuando la seroprevalencia de las hembras de reemplazo y de primero y segundo parto son menores al 70%, podría ocasionalmente presentarse parvovirus en alguno de estos animales. Si la seroprevalencia es menor al 40%, se corre el riesgo de que se pueda presentar un brote por el gran número de animales susceptibles. En este caso, se deben vacunar a todas las hembras de cría y mezclar hembras viejas con jóvenes, para que se infecten naturalmente.
3. Los anticuerpos maternos desaparecen alrededor del segundo mes de edad y los cerdos se infectan con el parvovirus a partir de los 3 meses de edad; esto depende del manejo y del estado sanitario de la granja, por lo que se encuentran anticuerpos de los animales de 4 a 6 meses de edad.
4. Cuando los cerdos de engorda tienen anticuerpos es indicativo de que el virus se encuentra circulando en la granja. Esto se puede aprovechar para incrementar la inmunidad en las hembras de cría jóvenes, por medio de la exposición con las heces. En granjas muy limpias en que los cerdos de engorda no tienen anticuerpos, es necesario vacunar al pie de cría constantemente.
5. Se considera positivo a un suero a partir de un título de 1:160 o 1:320, estos títulos muestran que los anticuerpos fueron inducidos por virus de campo; con la vacunación rara vez se alcanza este título (gráfica 7).
6. Títulos de más de 1:5, 120 en un gran número de sueros podría ser indicativo de un brote por parvovirus



Gráfica 6. Perfil serológico de parvovirus. Prueba IH. Se consideró positivo desde 1:320



Gráfica 7. Títulos de anticuerpos IH de parvovirus. Se consideró positivo igual o más de 1:320

## SINDROME DISGENESICO Y RESPIRATORIO DEL CERDO (PRRS)

### Características

El virus entra a la granja por medio de animales infectados y por el aire. Infecta a los animales susceptibles provocando signos clínicos respiratorios y reproductivos. El virus se establece en la piara y puede estar infectando en forma constante o ocasional a los cerdos del destete, a las hembras de cría, o a ambos grupos. El virus de PRRS exacerba infecciones secundarias con otros microorganismos. En una encuesta serológica hecha en rastros en México, se han encontrado seroprevalencias del 47% al,81% en los animales de estados productores de cerdos.

### Ejemplo de interpretación de resultados para PRRS

En una granja había signos clínicos en los cerdos en la etapa de lactancia, desarrollo, engorda y en las hembras de cría; en el seroperfil se encontró una elevada tasa de animales con anticuerpos de todas las edades (cuadro 20) una año más tarde se volvió a muestrear la granja y se encontró que el virus circulaba principalmente en los animales de crecimiento (cuadro 21).

Cuadro 20. Resultados de la serología efectuada inmediatamente después del inicio de un brote de PRRS.

Animales	Seropositivos (%)
Cerdas 5 días después del primer aborto	41
Cerdas 20 días después del primer aborto	45
Cerdos en crecimiento	100
Hembras de reemplazo antes de la monta	50
Cerdos de 5 semanas de edad que tenían signos clínicos	80
Líquido torácico de mortinatos	8

Cuadro 21. Resultados de la serología efectuada un año después de un brote de PRRS

Animales	Seropositivos (%)
1 mes de edad	0
2 meses	0
3 meses	75
4 meses	50
5 meses	0
Cerdas primerizas antes de la monta	0
Cerdas de 2 partos o menos	37
Cerdas viejas de 3 o más partos	12

### Ejemplo de interpretación de resultados AUJESZKY

En una granja donde los animales de 3 a 4 meses de edad tenían neumonías ocasionales, se efectuó un seroperfil de la enfermedad de Aujeszky.

El resultado que se obtuvo fue que los cerdos tenían anticuerpos maternos, desde los 15 días de edad hasta los 2 meses y medio. Entre los 3 y 4 meses de edad los animales eran susceptibles; volvían a aparecer animales con anticuerpos a partir de los 4 meses de edad, llegando a casi el 100% de los animales a los 6 meses. Este resultado indicó que estaba ocurriendo una infección, entre los 3 meses y medio y 4 meses de edad, la cual generalmente se manifiesta por neumonía al asociarse con *A. pleuroneumoniae* o *P. multocida*.

## BIBLIOGRAFIA

- Carlton, J. 2000. PRRS the Frustration Continues. *Pork*, 20 (2): 22-23.
- Coj, L. 1993. Perfil serológico contra la enfermedad de Aujeszky en una granja porcina donde se aplica una vacuna con delección de la glicoproteína gl. Tesis de Licenciatura. FMVZ, UNAM. México, D.F.
- <http://torla.sendnet.es/exopal/circulares/33circ.html>
- <http://www.amvec.com.mx/acap2000/memorias.doc>
- <http://www.fei.es/protocolo1/sero01.htm>
- <http://www.oie.int/norms/MANUALS>
- Gustafson, D. 1986. Pseudorabies. In: Leman et al (eds) *Diseases of Swine*. Sexta edic. Iowa State University Press, USA.
- Messenger, J. 1999. Put Serology to Work for you. *Pork*, 19 (2): 24-26.
- Morilla, A. 1985. Avances en Enfermedades del cerdo. Ed. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F.
- Morilla, A. 1989. *Inmunología Veterinaria*. Ed. Diana. México, D.F.
- Morilla, A., Diosdado, V., Corona, B., Soria, P. y González, V. 1995. Perfiles Serológicos de Granjas Porcinas Infeccionadas con el Virus de la Enfermedad de Aujeszky. *Técnica Pecuaria*, 33 (2): 92-98.
- Morilla, A. 1996. Los perfiles serológicos y microbiológicos para evaluar el estado sanitario de las granjas porcinas. *Ciencia Veterinaria*, 7: 273-313.
- Morilla, A. y González, V. 1997. Introducción al Diagnóstico Inmunológico de las Enfermedades de los Animales Domésticos. INIFAP- BTI- SAGAR.
- Morilla, A. 1997. Manual para el Control de las Enfermedades del Cerdo. SAGAR-INIFAP-PAIEPEME. México, D.F.
- Morilla, A. (editor) 1998. La Fiebre Porcina Clásica en las Américas. Simposium Internacional, Puebla.
- Morrison, R., and Thawley, D. 1989. Serologic status of pseudorabies virus in growing-finishing pigs in quarantined herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 8 (2): 97-109.
- Oirschot, J., Gielkens, A., Moorman, R., Bems, A. 1990. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Vet. Microbiol.*, 3: 43-51.
- Pineda, G. 2000. Interacción de la Vacunación de FPC. *Síntesis Porcina*. Julio-agosto. 7: 38-42.
- Thawley, D., Morrison, R. 1988. Programs for the elimination of pseudorabies virus from large herds of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 6: 204-209.

## 6. PRUEBA DE TUBERCULINA

### INTRODUCCION

La prueba de tuberculina es una prueba de hipersensibilidad retardada (tipo IV), en la que se pone al descubierto la sensibilidad de un animal al inyectar en sus tejidos un derivado proteínico del organismo específico con que el animal está, o ha estado infectado. La reacción que se presenta es de hipersensibilidad tardía mediada por células, ya que no puede transferirse de los animales sensibilizados a los normales por medio del suero, sólo por medio de linfocitos (imagen 46).

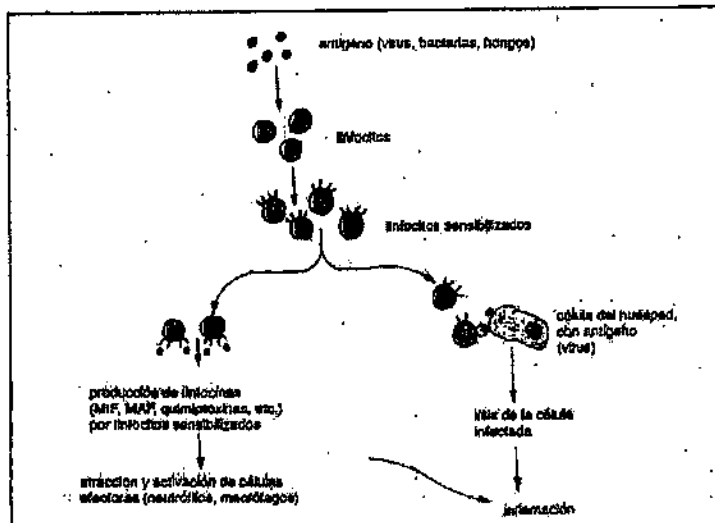


Imagen 46. Reacción de hipersensibilidad tardía

La prueba de tuberculina se lleva a cabo en un animal tuberculoso, por una reacción intradérmica contra la tuberculina (extracto antigénico obtenido del bacilo tuberculoso: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. Bovis* o *M. Avium*).

Cuando la tuberculina se inyecta por vía intradérmica a un animal normal, no hay respuesta inflamatoria local importante. Al contrario, en animales sensibilizados por una infección con el bacilo tuberculoso, se produce una respuesta de hipersensibilidad tardía. Después de la inyección en los animales infectados no se observan cambios detectables ni macroscópicos ni microscópicos, durante varias horas. Pasando 12 o 24 horas se produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular y como consecuencia de esto se observa eritema y tumefacción.

La reacción inflamatoria alcanza su máxima intensidad entre 24 y 72 horas después de la inyección, y puede persistir durante varias semanas, desapareciendo gradualmente. En reacciones muy graves puede aparecer una necrosis en el lugar de la inyección.

La reacción a la tuberculina en un animal sensibilizado es una reacción inflamatoria inmunológicamente específica mediada por células T.



Los usos de esta prueba es en la reaplicación de la prueba en hatos en los que se sabe están infectados de *Mycobacterium bovis*. Cuando se apruebe por el veterinario que esté a cargo de la campaña a nivel oficial, o para probar ganado que se sabe estuvo expuesto a los desperdicios de hatos infectados o en general al *Mycobacterium bovis*.

Esta prueba se debe aplicar solamente por veterinarios capacitados. Se rasura el sitio de inoculación alrededor de 7 cm cuadrados. No se debe realizar otra prueba de tuberculina al mismo tiempo que es utilizada la prueba simple (cervical).

La lectura de la prueba se realiza después de 72 + - 6 horas de la inoculación. Todas las reacciones se miden y se anotan; la diferencia entre la lectura inicial y la final indican el incremento en el grosor de la piel y determinan su clasificación.

Interpretación y clasificación: cualquier reacción detectable se considera como evidencia de infección por *Mycobacterium bovis* y se clasifica como reactor. Sin excepciones.

### PRUEBA DOBLE COMPARATIVA

En esta prueba se inocula de forma intradérmica 0.1 ml de PPD bovina y PPD aviar en un área del cuello, rasurada y medida para su posterior inoculación .

La prueba doble comparativa es la única prueba que confirma o descarta animales sospechosos. Su utilidad es para determinar, cuando la causa probable de la sensibilidad a la tuberculosis en el animal sospechoso es *Mycobacterium avium*. Esta prueba no se utiliza en hatos ya clasificados como reactores, excepto cuando el hato haya probado por lo menos 2 pruebas completas con resultados negativos. Al igual que las otras pruebas, debe ser realizada por veterinarios capacitados.

La prueba se puede aplicar dentro de los 10 días siguientes a la aplicación de la prueba del pliegue anocaudal o hasta después de no menos de 60 días de aplicada la primera prueba.

El sitio de aplicación es a 10 cm debajo de la cresta del cuello y 13 cm debajo del sitio anterior. La lectura se realiza de la misma manera que las otras pruebas.

### DESARROLLO DE LA PRACTICA

#### MATERIAL

- Tuberculina PPD bovina
- Jeringas desechables para insulina
- Algodón
- Papel absorbente
- Alcohol al 70%
- Rasuradora eléctrica (de preferencia recargables)
- Vernier

## METODO

- La prueba que se va a realizar es la prueba anocaudal o intradérmica única.
  - No se debe realizar la prueba en animales que hayan sido tratados con algún fármaco o hayan sido inoculados con algún biológico dentro de las 72 horas anteriores a la prueba. Ya que por ejemplo, las vacunas tienen un efecto depresor en el sistema inmune del animal y reducen la habilidad de respuesta a la prueba.
1. Identificar correctamente al animal que se le va a realizar la prueba y anotarlo.
  2. Se hace la correcta sujeción del animal con el fin de inmovilizarlo.
  3. El sitio de aplicación en el pliegue es aproximadamente a 7 cm de distancia de la base de la cola, en el centro del pliegue.
  4. El sitio de inoculación debe estar libre de pelo, por lo que si es necesario se rasura esta zona.
  5. Se observa y se palpa el pliegue, para identificar alguna anomalía cerca del sitio de inyección, si es así se debe anotar para no ocasionar errores en la interpretación de los resultados.
  6. Se mide el pliegue con el vernier antes de inocular la tuberculina.
  7. Realizar la asepsia del sitio a inocular con el papel absorbente y después con algodón y alcohol.
  8. Insertar la aguja de forma intradérmica, formando un ángulo de 45° e inocular 0.1 ml de PPD bovina en el pliegue anocaudal; un abultamiento aparecerá en el sitio de inoculación, si es que la aplicación fue bien realizada.
  9. Después de 72 horas se lleva a cabo la lectura de la prueba, midiendo con el vernier el grosor del pliegue donde se inoculó la tuberculina. La diferencia entre la lectura inicial y la final, indican el incremento en el grosor del pliegue y determinan su clasificación.

### Resumen de la técnica

Inmovilizar al animal



Dejar libre de pelo el sitio de aplicación



Observación, palpación y medición del pliegue antes de la inoculación.



Asepsia de la zona a inocular



Inoculación de la tuberculina



Observación de resultados a las 72 hrs.

## INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

### Interpretación general

Interpretación de la prueba: los animales que presenten reacciones de más de 4 mm estarán clasificados como positivos, de 2 a 4 mm como sospechosos y de menos de 2 mm como negativos.

### Interpretación individual

Se recomienda que los resultados individuales de la prueba tuberculínica comparativa intradérmica se interprete de la siguiente manera:

- Cualquier tumefacción que muestre la presencia de edema se debe considerar como una reacción positiva
- Cuando no se aprecia edema ni tumefacción y la piel sólo muestra un aumento de grosor de un máximo de 2 mm, se debe considerar como reacción negativa. La tumefacción de la piel con un aumento de 3 mm se debe clasificar como dudosa, y aquellas que muestran un grosor de 4 mm o más, como positivas.

La interpretación en grupo de los resultados a la prueba de la tuberculina se pueden clasificar como se muestra a continuación:

1. Animales que muestran una reacción positiva o dudosa a la tuberculina aviar y negativa a la de mamíferos son reactores negativos y pueden permanecer en el rebaño.
2. Animales que dan una reacción dudosa a la tuberculina de mamíferos y negativa a la tuberculina aviar son reactores indecisos y se les debe aplicar de nuevo la prueba.
3. Animales que muestran una reacción positiva o dudosa a la tuberculina aviar y positiva o dudosa a la tuberculina de mamíferos; si el aumento del grosor de la piel, como reacción a la tuberculina de mamíferos, no es por lo menos 4 mm más grande que el aumento en la zona donde se aplicó la tuberculina aviar, se deben clasificar como:
  - a) reactores negativos si está presente una infección no específica;
  - b) reactores indecisos y sujetos a una nueva prueba si no se confirma la presencia de una infección no específica.
4. Animales que dan una reacción positiva a la tuberculina de mamíferos y negativa a la tuberculina aviar; cuando el aumento del grosor de la piel en el caso de la tuberculina de mamíferos no excede al aumento de la aviar en más de 6 mm, se deben clasificar como:
  - a) reactores indecisos y sujetos a una nueva prueba si se descubre la existencia de una infección específica;

- b) reactores positivos y apartados del rebaño si no se confirma la presencia de una infección no específica.
5. Animales que dan una reacción positiva a la tuberculina de mamíferos y positiva o dudosa a la tuberculina aviar; cuando la intensidad de la reacción cutánea a la tuberculina de mamíferos es por lo menos 5 o 6 mm mayor que el aumento de la tuberculina aviar, se deben clasificar como:
- a) reactores indecisos y sujetos a una nueva prueba si está presente una infección no específica;
  - b) reactores positivos que deben retirarse del rebaño si no se establece la presencia de una infección no específica.
6. En cualquier prueba, los animales que muestren una reacción positiva a la tuberculina de mamíferos, dudosa o negativa a la tuberculina aviar se deben clasificar como reactores positivos y deben ser apartados del rebaño cuando la intensidad de la reacción cutánea a la tuberculina de mamíferos es más de 6 mm más grande que la reacción a la tuberculina aviar.



## BIBLIOGRAFIA

- Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H. y Ginsberg, H. 1990. Tratado de Microbiología con Inclusión de Inmunología y Genética Molecular. 3ª edición. Ed. Salvat . España.
- Francois B. J. 1983. Inmunología. Ed. Limusa. México, D. F.
- <http://senosa.mecan.bov.ar/animal/progtub1.htm>
- <http://www.oie.int/norms/MANUAL/A>
- Kelly, W. R. 1983. Diagnóstico Clínico Veterinario. Ed. Continental S.A. México, D. F.
- Merchant, I. y Packer, R. 1988. Bacteriología y Virología Veterinarias. 3ª edición. Ed. Acribia. España.
- NORMA Oficial Mexicana. NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*)
- Tizard, I. 1995. Inmunología Veterinaria. 4ª edición. Ed. Interamericana, Mc Graw Hill. México, D.F.
- SARH. 1990. Normas y Procedimientos de las Campañas Nacionales Contra la Tuberculosis Bovina y la Brucelosis. Programa de acreditación de MVZ. CNMVZM. México, D.F.

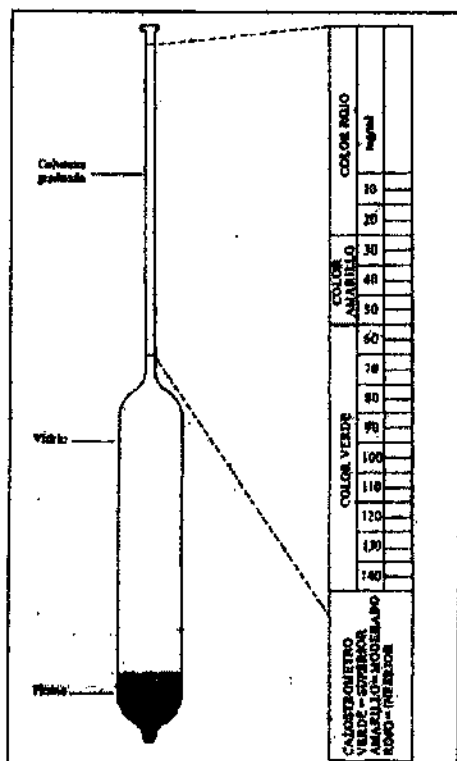


Imagen 49. Esquema de graduación del calostrómetro

## DESARROLLO DE LA PRACTICA

### MATERIAL

- Calostrómetro
- Toallas de papel
- Calostro materno de primer ordeño
- Probeta graduada con capacidad para 500 ml o un bote medidor de leche para 2 lt .

### METODO

1. Se realiza la limpieza de pezones para posteriormente ordeñar a la vaca.
2. Se toma una muestra de calostro de primer ordeño después del parto en la probeta o en el bote.
3. Se introduce el calostrómetro en la muestra, separando la espuma que se forma para hacer una mejor lectura de resultados.
4. Se realiza la lectura cualitativa (color) y la cuantitativa (mg/ml) del calostrómetro en el punto donde emerge del calostro y se anotan los resultados.

## INTERPRETACION DE RESULTADOS

La calidad del calostro se clasifica de acuerdo a su densidad en tres categorías, se muestran en el cuadro 23:

Cuadro 23. Interpretación de resultados de calidad de calostro

Características	Calidad superior	Calidad media	Calidad inferior
Color	Verde	amarillo	Rojo
Gravedad específica	1.047 a 1.075	1.035 a 1.047	Menor a 1.035
Concentración de Ig's	50 a 123 mg/ml	20 a 50 mg/ml	Menor a 20 mg/ml
Observaciones	Es la mejor opción para alimentar al becerro neonato.	Difícilmente llenará los requerimientos mínimos de ac's que el neonato necesita. Aunque se puede dar 12 hr después del primer calostro	No administrar este tipo de calostro a los neonatos, ya que no confiere protección. Se puede dar a los 2 o 3 días de edad en fresco, o fermentarlo para alimentación de crianza

El becerro neonato debe ingerir en promedio 3.25 lt de calostro con una concentración de ac's de 80 mg/ml dentro de las primeras 15 horas de vida. Lo que equivale a 4.0 lt de calostro con un contenido de anticuerpos de 65 mg/ml administrados dentro de las primeras 15 hrs de vida y divididos en 2 raciones.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguado, J. Aguirre, M. y Cabello, E. 1982. Manual sobre Ganado Productor de Leche. Ed. Diana. México, D.F.
- Alkemade, J., and Fiallos. 1989. Inmunología del ternero recién nacido. I Congreso de Ciencias Veterinarias. Maracaibo, Venezuela.
- Blood, D., Henderson, J., y Radostits, O. 1993. Medicina Veterinaria. 6ª edición. Ed. Interamericana. México, D.F. vol. 1
- Catell, M. 2000. Liquid Gold. Dairy Herd Management, 37 (1): 41-45.
- El Manual Merck de Veterinaria. 1993. 4ª edición. Ed. Oceano/Centrum. Barcelona, España.
- Fleenor, W. and Scott, G. 1980. Hydrometer test forestimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. J. Dairy Sci; 63:pag.973
- [http://edis.ifas.ufl.edu/BODY\\_DSISO](http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_DSISO)
- <http://prevmed.vet.ohio-state.edu/extension/extnlv221.hetm#>. THE IMPORTANCE OF CALOSTRAL IMMUNITY FOR BEEF.
- <http://www.cvmbs.calostate.edu/film/sops/sopcalostrum.htm>
- Land O'Lakes, Inc. 1989. Nutricionista Internacional. Minnesota, U.S.A.
- Larson, B., Heary, H., and Devery, J. 1980. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. J. Dairy Sci., 63:665.
- Lewis, L. 1982. Agents of disease IV Class Handout. Colo. Sta. Univ. Fort Collins, CO. USA, 80523.
- Medina, C. 1987. Aspectos clínicos nutricionales y de manejo durante el proceso de recría. Programa de Actualización Técnica. Liconsa. México, D.F.
- Molla, A. 1980. Estimation of bovine colostrum immunoglobulins by refractometry. Vet. Rec., 107 (2):87-91.
- Morilla, A., y Bautista, C. 1986. Manual de Inmunología. Ed. Diana. México, D.F.
- Olsen, R., y Krakowa. 1983. Inmunología e Inmunopatología de Animales Domésticos. Ed. Manual Moderno México, D.F.
- Tizard, I. 1995. Inmunología Veterinaria. 4ª edición. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. México D.F.
- Scott, G., Fleenor, W. and Kleese, W. 1981. Colostral immunoglobulin concentration in two fractions of first milking post-partum and five additional milking. J. Dairy Sci., 64 (3):115-119.

## 8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS SÉRICAS EN BECERROS CALOSTRADOS Y NO CALOSTRADOS

### INTRODUCCION

El nivel de inmunoglobulinas (Ig's) séricas en el becerro neonato es un factor que determina su resistencia a enfermedades infecciosas durante el primer mes de vida.

Los animales que no han lactado poseen en condiciones normales, concentraciones extremadamente bajas de Ig's en el suero. La absorción exitosa de las Ig's del calostro suministra Ig's séricas.

Las características de las inmunoglobulinas varían en función, concentración, duración en el organismo, etc., las principales se muestran en el cuadro 24.

Cuadro 24. Características de las inmunoglobulinas

Ig A	Ig G	Ig M
Protege cubiertas orgánicas excepto piel y pezuñas	Protege el espacio intersticial. Por lo que constituye la línea de defensa orgánica durante el periodo neonatal.	Protege el torrente sanguíneo
Elimina agentes infecciosos del aparato respiratorio, pared del tubo digestivo, urinario, reproductor y conjuntiva.	Abundante en calostro de 1er ordeño	Gran cantidad en el calostro
El neonato solo es capaz de producir esta Ig hasta el día 62 de vida	La producción endógena por la cría empieza desde el día 13 de vida, y en cantidad suficientes hasta el día 30	Los becerros producen Ig M aún antes de nacer, sólo niveles significativos el día 7 de vida
Ig A calostrual dura en sangre solo 1ª semana de vida.	Dura en la sangre del becerro 34 días	Duración en el organismo del becerro 5 días
Presente solo en calostro de 1er ordeño		

Numerosas investigaciones han encontrado una relación entre la supervivencia de becerros neonatos y una concentración elevada de Ig's séricas; siendo la mortalidad mayor en aquellas con niveles menores y viceversa. Esta probabilidad mayor de supervivencia han sido demostradas en enfermedades específicas propias de becerros, tales como colisepticemia, colibacilosis entérica, salmonelosis, etc.

En un estudio se encontró que becerros sanos tenían niveles de Ig's más altos que becerros enfermos de diarrea y éstas eran inferiores en animales que habían muerto de este padecimiento. A las 24 horas de vida, los becerros que tuvieron diarrea y no se recuperaron, tenían 83.7% de los niveles de Ig G de los animales sanos, y en los que murieron de diarrea era de 66.8%. Los niveles de Ig A en los



becerros sobrevivientes a diarreas y en animales diarreicos que murieron fueron de 55.5 y 44.5% con respecto a los valores observados en los becerros sanos. Esto se resume en el cuadro 25.

Cuadro 25. Niveles de Ig's de becerros sanos, enfermos y muertos por diarrea

Niveles sanguíneos encontrados	Becerros sanos	Becerros diarreicos recuperados	Becerros diarreicos muertos
Ig G %	100	83.7	66.8
Ig S %	100	55.5	44.5

Los factores que se listan enseguida determinan el nivel de anticuerpos en el becerro neonato:

✓ **Volumen de calostro producido por la madre**

La duración de la gestación influye sobre la cantidad de calostro producido, ya que se ha observado que los nacimientos prematuros traen como consecuencia una cantidad insuficiente de calostro disponible para la cría

Factores como la edad y número de lactancias de la madre están correlacionados con la cantidad y calidad del calostro producido. También factores ambientales, tales como alimentación, clima, manejo pueden influir sobre esto.

✓ **Cantidad de calostro ingerido**

La cantidad recomendada de calostro que se debe proporcionar corresponde a un 10% del peso del becerro, por ejemplo en becerros Holstein-friesian de 3.5 a 4 litros. El cuadro 26 muestra la cantidad ingerida de calostro y los problemas más comunes presentados al administrarse menos cantidad de la recomendada, así como el valor de las pruebas más comunes realizadas para detectar la concentración de Ig's:

Cuadro 26. Relación entre cantidad de calostro ingerido y presentación de problemas .

Cantidad ingerida de calostro	IgG (mg/ml)	IgM (mg/m)	IgA (mg/m)	Prueba de sulfato de zinc	Prueba de refractometría		Problemas más comunes
					plasma	Suero	
10%	30	5	3	30	8	7	Ninguno
5%	15	2	2	15	6	5	Neumonías
2.5%	7	1	1	10	5	4	Diarreas
0%	1	0	0	5	4	3	Septicemias

Una cantidad insuficiente de calostro ingerido por el becerro cuando es amamantado en forma natural puede deberse a varias causas, tales como debilidad de la cría, problemas físicos en patas o maxilares del neonato; o por problemas físicos de la madre como tamaño de la ubre y de la tetas o por pezones lesionados.

### ✓ **Calidad del calostro**

Para considerar que el calostro que se va administrar a un becerro es de buena calidad debe realizarse una prueba para determinar densidad y concentración de Ig's en el calostro. El cual debe tener una densidad promedio mayor de 1.05 y una concentración de Ig's promedio de 90 mg/ml para poder estar seguros que existe una transferencia de inmunidad pasiva adecuada. Ya que la concentración de Ig's está relacionado con la absorción intestinal.

### ✓ **Absorción del calostro**, los siguientes puntos intervienen en la absorción del calostro:

- Tiempo transcurrido entre el nacimiento y la ingestión de calostro.

Los becerros deben ingerir el calostro dentro de las primeras 24 horas de vida debido que en estos animales la actividad proteolítica del tracto digestivo es baja y se reduce aún más porque el calostro posee inhibidores de tripsina, por lo que las proteínas del calostro no se degradan ni se utilizan como fuente de alimento, sino que llegan intactas al intestino delgado y son absorbidas, para distribuirse vía sanguínea y proveer de inmunidad al neonato. Además, la duración de la permeabilidad intestinal va en decremento, se considera que en becerros este periodo alcanza su máximo después del nacimiento y disminuye después de seis horas; es posible que se deba a que las células intestinales que absorben las Ig's se reemplazan por una población de células más maduras.

Por lo anterior, lo más recomendable es alimentar al neonato con calostro de 2 a 6 horas después del nacimiento y posteriormente, proveer de 1.5 a 3 litros en la segunda toma antes de 12 horas de edad.

- Presencia o ausencia de la madre

Uno de los factores que se asocia en la absorción del calostro, es la presencia de la madre; se ha demostrado que terneras alimentadas con cantidades medidas de calostro en presencia de la madre, absorben más Ig's que las que se alimentan con la misma cantidad, pero en ausencia de la madre.

- Condiciones del medio ambiente

Se debe evitar al máxima situaciones de estrés en el becerro neonato (grado de confinamiento, climas extremos, etc), ya que al presentarse una situación de este tipo da lugar a liberación de corticosteroides y catecolaminas, bloqueando la absorción de Ig's (principalmente Ig A).

Las condiciones de higiene deben ser las más adecuadas para evitar la presencia de patógenos cerca del alojamiento del becerro, ya que hay microorganismos que pueden ingresar a este antes que el calostro (Rotavirus, E. coli).

La determinación de Ig's es útil como un método para examinar la condición de los becerros adquiridos de centros de cría y para diagnosticar hipogamaglobulinemia en becerros enfermos, así como para investigar un problema de morbilidad y mortalidad en una población de becerros.

Existen diferentes pruebas que determinan la cantidad de anticuerpos en el becerro neonato, de las cuales 3 son las más utilizadas: la prueba de refractometría (imagen 50), prueba de precipitación con sulfito de sodio, y la prueba de turbidez de sulfato de zinc.



Imagen 50. Refractómetro

En la presente práctica se realizará la prueba de refractometría, la cual mide la proteína total y constituye un método indirecto pero útil para la estimación de Ig's en el suero. Esta prueba debe utilizarse únicamente en becerros mayores de 24 horas y menores de 3 semanas de edad y que no esté deshidratado. Las ventajas de esta prueba son su bajo costo, su sencillez y rapidez, por lo que la hace una buena opción para determinar la concentración de Ig's en suero cuando se hacen muestreos de grupo.

#### DESARROLLO DE LA PRACTICA

##### MATERIAL

- Tubo vacoutainer sin anticoagulante
- Aguja para vacoutainer
- Algodón y alcohol
- Refractómetro manual

##### METODO

1. Se van a muestrear dos becerros, uno que haya recibido calostro y otro que no haya ingerido calostro.



2. Sujetar al becerro derribándolo (imagen 51), y aplicando presión para inmovilizarlo y se le estira el cuello para poder punsionar en la yugular.



Imagen 51. Becerro derribado

3. Una vez inmovilizado se prepara el tubo vacoutainer y en la zona donde se va a punsionar se limpia con un algodón muy humedecido con alcohol, con el fin de que el pelo del becerro, que es muy abundante y largo, se pegue y sea más fácil localizar la vena. Se realiza una ligera presión sobre el cuello para que la vena resalte y una vez localizada se introduce la aguja (imagen 52, 53, 54).



Imagen 52. Introducción de la aguja a la yugular



Imagen 53. Tubo vacoutainer llenándose



Imagen 54. Tubo lleno

4. Se retira la aguja al obtener la sangre necesaria.
5. Identificar los tubos y dejarlos reposar para obtener el suero

6. Una vez obtenido el suero se colocan unas gotas en el prisma del refractómetro (observar la imagen 55 el sitio que señala la flecha).

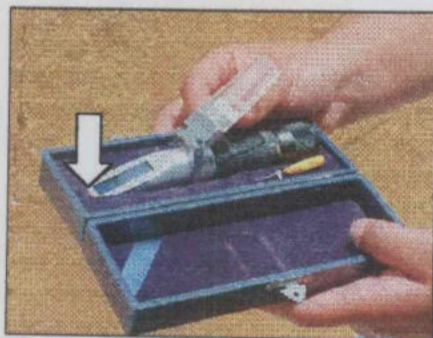


Imagen 55. Prisma del refractómetro.

7. Realizar la lectura de titulación de la proteína total a partir de la escala del refractómetro graduada en g/dl.

#### **Resumen de la técnica**

Inmovilización del becerro



Toma de la muestra



Obtención del suero



Colocar suero en refractómetro



Lectura de resultados



## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La interpretación de los resultados se realizarán comparando los valores de proteína obtenidos en la lectura de resultados con los del cuadro 27.

Cuadro 27. Interpretación de resultados en determinación de concentración de Ig's séricas en becerros calostrados y no calostrados.

Proteína total g/ml	Interpretación	Características
5/100	Estos becerros no han absorbido Ig's	Al exponerse a patógenos sucumbirán con relativa facilidad. De este grupo de animales cuando menos un 25% mueren a consecuencia de septicemias causadas por patógenos (E. coli) a pesar de ser tratados.
5 y 6/100	Se considera han absorbido Ig's pero no en cantidades suficientes.	Aproximadamente 10% de los animales con esta titulación de proteína mueren a consecuencia de diarreas. Un tratamiento médico adecuado puede salvar un mayor número de animales que en el grupo anterior.
6/100	Estos han absorbido cantidades adecuadas de Ig's	Las posibilidades de supervivencia son altas, ya que estos becerros difícilmente desarrollan enfermedad, y si es así, responden favorablemente a un tratamiento. En este grupo la mortalidad es de 3%.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguado, J. Aguirre, M. y Cabello, E. 1982. Manual sobre Ganado Productor de Leche. Ed. Diana. México, D.F.
- Besser, T., Garmedia, A., Mcguire, T., and Gay, C. 1985. Effect of calostrual immunoglobulin g1 and immunoglobulin M concentrations on immunoglobulin absorption in calves. *J. Dairy Sci*; 68: 2033.
- Blood, D., Henderson, J., y Radostits, O. 1993. Medicina Veterinaria. 6ª edición. Ed. Interamericana. México, D.F. vol. 1
- Bush, L., and Staley, T. 1980. Absorption of colostrual immunoglobulins in newborn calves. *J. Dairy Sci*; 63:672
- De Alba, J. 1985. Reproducción Animal. Ed. Científicas. México.
- De la Garza, R. 1982. Correlación Entre los Niveles de Inmunoglobulinas, Diarreas y Neumonías en Becerras Recién Nacidas. Tesis Profesional. E.N.E.P- U.N.A.M. Cuautitlán, México.
- Dukes, H., y Swenson, M. 1985. Fisiología de los Animales Domésticos. Ed. Mexicana M. Aguilar S.A. México.
- El Manual Merck de Veterinaria. 1993. 4ª edición. Ed. Oceano/Centrum. Barcelona, España.
- Franck, R. 1999. Try Calf, Side IgG Test. *Dairy Herd Management*, 36 (12): 23-26.
- Quigley, J. 1995. Donde y como se realizan los partos. *Hoard's Dairyman* en español, 5: 75-79.
- Logan, E. 1974. Quantitative studies on serum immunoglobulin levels in suckled calves from birth five weeks. *Vet. Rec*; 94:367
- Maeng, W., Chang, M., and Song, B. 1992. Effect of colostrum and concentrated immunoglobulin colostrx feeding on the plasma immunoglobulin concentrations and survival of nexborn calves. *Korean J. Anim. Nutr. Feedstuffs* 16 (3):142.
- Martínez, A. 1987. Manual de Crianza de Becerras Lecheras. Ed. Agrotécnica. México. D.F.
- Medway, W., Prier, J., y Wilkinson, J., 1986. Patología Clínica Veterinaria. Ed. UTEHA. México, D.F.
- Morilla, A., y Bautista, C. 1986. Manual de Inmunología. Ed. Diana. México, D.F.
- Nocek, J., Braund, D. and Warner, R. 1984. Influence of neonatal colostrum administration, immuniglobulin, and continued feeding of colostrum on calf gain, healt, and serum protein. *J. Dairy Sci.*, 67:319
- Olson, J. 1976. The calf: A study of passive immunity. M-S. Thesis. Universidad of Minnesota, Mineapolis, USA
- Reza, G. 1987. Cuidado con las Diarreas. Programas de actualización técnica. Liconsa. México, D.F.
- Stott, G., Marx, D., Menefee, B. and Nightengale, G. 1979. Colostral Immunoglobulin Transfer in Calves, I. Period of Absorption. *J. Dairy Sci.*, 62(10):90-94.

- Stott, G., Marx, D., Menefee, B. and Nightengale, G. 1979. Colostral Immunoglobulin Transfer in Calves. III. Amount of Absorption. J. Dairy Sci., 62(12):133-138.
- Stott, G., Marx, D., Menefee, B. and Nightengale, G. 1979. Colostral Immunoglobulin Transfer in Calves. IV. Effect os Suckling. J. Dairy Sci., 62, (12):223-228.
- Tizard, I. 1995. 4ª ed. Inmunología Veterinaria. 4ª edición. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. México D.F.

## GLOSARIO

- Adyuvante. Sustancia que, cuando se administra junto con un antígeno, intensifica la respuesta inmunitaria normal.
- Afinidad. Fuerza de unión entre dos ligandos. Por lo general se expresa como una constante de asociación ( $K_a$ ).
- Agammaglobulinemia. Ausencia de todas las inmunoglobulinas séricas.
- Aglutinación. Amontonamiento de antígenos particulados por acción de los anticuerpos.
- Alelos. Formas alternativas de un gen.
- Alergenos. Antígeno que provoca hipersensibilidad tipo I.
- Alergia. Hipersensibilidad inmediata (tipo I). Aunque la consideran también para describir cualquier reacción molesta de tipo inmunológico o similar.
- Anafilaxis. Reacción de hipersensibilidad inmediata sistémica y grave.
- Anticuerpo. Molécula de inmunoglobulina sintetizadas a causa de la exposición a un antígeno, las cuales pueden combinarse de manera específica con ese antígeno.
- Antígeno. Sustancia que puede inducir una respuesta inmunitaria.
- Antígenos de grupo sanguíneo. Antígenos encontrados en la superficie de los eritrocitos.
- Antisuero. Suero que contiene anticuerpos específicos.
- Arthus, reacción de. Reacción inflamatoria local, cutánea, debida a una hipersensibilidad de tipo III; es inducida por la inyección de un antígeno a la piel de un animal inmunizado.
- Cápside. Cubierta proteica de un virus.
- Complejo inmunitario. Complejo de antígeno y anticuerpo.
- Complemento, sistema del. Complejo sistema de enzimas ligadas y proteínas aglutinantes, que se activa por diversos factores, en particular por la interacción antígeno-anticuerpo, y que produce una gran variedad de consecuencias biológicas, como lisis de las membranas celulares y opsonización.



- Dermatitis alérgica por contacto. Trastorno cutáneo inflamatorio mediado por células que ocurre como consecuencia de una reacción de hipersensibilidad tipo IV frente a células cutáneas químicamente modificadas.
- Determinante antigénico. Area de una molécula de antígeno que estimula una respuesta inmunitaria específica contra la cual esa respuesta está dirigida. (sinónimo de epitopo).
- Difusión en gel. Técnica de inmunoprecipitación que incluye que los reactivos se encuentren y precipiten en un gel transparente como agar.
- ELISA. Prueba inmunológica que utiliza antiglobulinas ligadas a enzimas y un sustrato unido a las paredes de tubos de poliestireno.
- Endotoxina. Componente lipopolisacárido de la pared celular de las bacterias gramnegativas.
- Enfermedad hemolítica. Enfermedad que ocurre como consecuencia de la destrucción de eritrocitos por anticuerpos transferidos al animal joven de su madre.
- Especificidad. Es la capacidad que tiene una prueba serológica de identificar a los animales no infectados.
- Falsos negativos. Son aquellos animales infectados pero con resultados negativos a la prueba.
- Falsos positivos. Son aquellos animales no infectados pero positivos a la prueba.
- Genes. Unidades de DNA que codifican la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica.
- Hemaglutinación. Aglutinación de eritrocitos.
- Hemolisina. Anticuerpo que puede lisar eritrocitos en presencia del sistema del complemento.
- Hemólisis. Destrucción o muerte de los glóbulos rojos de la sangre.
- Hipersensibilidad. Respuesta inflamatoria inmunológicamente mediada contra un antígeno normalmente inocuo.
- Histocompatibilidad, antígenos de. Proteínas de membrana celular necesarias para presentar el antígeno a las células sensibles a antígenos.



- Homólogo. Parte similar en estructura, posición y origen a otro órgano.
- Inmunidad. Estado de resistencia a una infección.
- Inmunización. Es la administración de un antígeno a un animal con la intención de conferirle inmunidad.
- Inmunodifusión. Sinónimo de la técnica de difusión en gel
- Inmunoperoxidasa. Prueba inmunológica en la que se utilizan anticuerpos químicamente conjugados con la enzima peroxidasa.
- Inoculación. Administración de una vacuna por inyección o rasguño.
- Isotipo. Sinónimo de clase y subclase. Son los tipos de moléculas de inmunoglobulina comunes a todos los miembros de una especie.
- Lipemia o quiluria. Presencia de grasa en la sangre.
- Macrófagos. Células fagocíticas que poseen un solo núcleo redondo.
- Neutralización. Bloqueo de la actividad de un microorganismo o una toxina por la acción de los anticuerpos.
- Neutrófilos. Granulocitos polimorfonucleares cuyos gránulos no se tiñen intensamente con colorantes ácidos o básicos.
- Precipitación. Agrupamiento de moléculas solubles de antígeno por acción de los anticuerpos; lo cual produce un precipitado visible.
- Radioinmunoensayo. Prueba inmunológica que requiere el uso de un reactivo marcado con un isótopo.
- Reacción cruzada. Reacción de un anticuerpo con un antígeno aparentemente no relacionado, la cual ocurre debido a que dos antígenos poseen epitopos comunes.
- Reacción primaria. Es la reacción inicial contra un tejido extraño injertado.
- Reacción secundaria. Rechazo de un injerto por un huésped sensibilizado
- Receptor. Estructura de la superficie celular que se une específicamente a sustancias del líquido que la rodea.
- Respuesta inmunitaria primaria. Respuesta inmunitaria que se presenta después de una primera exposición a un antígeno.

- Respuesta inmunitaria secundaria. Respuesta inmunitaria que ocurre después de una segunda o subsecuente exposición a un antígeno.
- Respuesta secundaria. Respuesta de un animal sensibilizado o un antígeno extraño.
- Sensibilidad. Es la capacidad que tiene la prueba de identificar correctamente a los animales que están o estuvieron infectados.
- Serología. Ciencia de la detección de antígenos y anticuerpos.
- Suero. Líquido transparente amarillento que se obtiene después que la sangre ha coagulado y se ha permitido que el coágulo se retraiga.
- Titulación. Medición de la concentración de anticuerpos específicos en un suero, mediante el ensayo de la actividad de anticuerpos de diluciones crecientes de dicho suero.
- Título. Es el recíproco de la dilución más alta de un suero que da una reacción deseada en una prueba inmunológica.
- Tolerancia. Ausencia específica de respuesta inmunitaria hacia un antígeno.
- Tuberculina. Extracto del bacilo tuberculoso que se utiliza en una prueba cutánea de diagnóstico de tuberculosis.
- Tubérculo. Respuestas inflamatorias persistentes a la presencia de micobacterias en tejidos.
- Vacuna. Suspensión de microorganismos viables o inactivados, que se utiliza como antígeno a fin de conferir inmunidad.

## ANEXO 1

Pruebas de laboratorio de virología, serología y biología molecular para diagnóstico de algunas enfermedades, por especie.

### AVES

ENFERMEDAD	PRUEBA	PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO	MUESTRA	TIEMPO MINIMO DE LA PRUEBA
BRONQUITIS INFECCIOSA	Cultivo celular	Aislamiento viral	Tráquea, pulmón, riñón	72 horas
	Inmunofluorescencia	Identificación de virus	Tráquea, pulmón, riñón	3 horas
	Seroneutralización	Determinación de niveles de anticuerpos	1 ml de suero	5 días
CORIZA	Cultivo	Aislamiento bacteriano	Cabeza y cuello	72 horas
GUMBORO	Cultivo celular	Aislamiento viral	Tráquea, pulmón, riñón	72 horas
	m.i.f.	Determinación de inmunidad celular	2 ml de sangre completa (EDTA)	48 horas
	Seroneutralización	Determinación de niveles de anticuerpos	1 ml de suero	8 días
HEPATITIS POR CUERPOS DE INCLUSION	Cultivo celular	Aislamiento viral	Hígado	72 horas
	Seroneutralización	Determinación de niveles de anticuerpos	1 ml de suero	8 días
LARINGOTRAQUEITIS	Cultivo celular	Aislamiento viral	Tráquea	72 horas
	Seroneutralización	Determinación de anticuerpos	1ml de suero	8 días
	Cultivo celular	Aislamiento viral	Tráquea, pulmón, riñón	72 horas
MAREK	M.I.F.	Determinación de inmunidad celular	2 ml de sangre completa (EDTA)	48 horas
	Seroneutralización	Determinación de niveles de anticuerpos	5 ml de suero	48 horas

AVES (cont)				
NEWCASTLE	Cultivo celular	Aislamiento viral	Tráquea, bazo, cerebro	72 hrs
	Seroneutralización	Determinación de niveles de anticuerpos	5ml de suero	48 hrs
PASTERELOSIS	M.I.F.	Determinación de inmunidad celular	2 ml de sangre completa (EDTA)	48 hrs
	Cultivo	Aislamiento bacteriano	Cabeza, tráquea, pulmón	72 hrs
SALMONELLOSIS	Agutinación en placa	Determinación de ac's	1 ml de suero	24 hrs
	Cultivo	Aislamiento bacteriano	Huevo, ave completa	5 días
	M.I.F.	Determinación de inmunidad celular	2 ml de sangre completa (EDTA)	48 hrs
SINDROME DE BAJA POSTURA	Cultivo celular	Aislamiento viral	Ovario y oviducto	72 hrs
	Inhibición de la hemoaglutinación	Determinación de niveles de anticuerpos	1 ml de suero	2 hrs
VIRUELA	Cultivo celular	Aislamiento viral	Cresta y piel	72 hrs
	Seroneutralización	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	48 hrs



**BOVINOS, OVINOS, CAPRINOS**

ENFERMEDAD	PRUEBA	PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO	MUESTRA O ESPECIMEN	TIEMPO MINIMO DE LA PRUEBA
BRUCELOSIS	Anillo de Bang (prueba de ható)	Determinación de ac's	5 ml de suero	24 hrs
	Contrainmunolectroforesis	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	48 hrs
	Fijación de complemento	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	48 hrs
	Huddlesson (aglutinación en placa)	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	24 hrs
	Lenta en tubo (aglutinación)	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	72 hrs
	Mercapto-etanol Precipitación	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	72 hrs
DERRIENGUE	Rivanol	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	72 hrs
	Cultivo celular	Aislamiento viral	Encéfalo	10 días
DVB	Inmunofluorescencia	Identificación del virus	encéfalo	3 hrs
	Contra inmunolectroforesis	Determinación de ac's	5 ml de suero	24 hrs
	Cultivo celular	Aislamiento viral	Sangre, ganglio linfático, bazo	10 días
IBR	Cultivo celular	Aislamiento viral	Fetos abortados, vesícula, exudados	10 días
	Fijación de complemento	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	48 hrs
	Seroneutralización	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	8 días



**BOVINOS, OVINOS, CAPRINOS (CONT)**

PARATUBERCULOSIS	Contrainmunoelectro- resis	Determinación de ac's	5 ml de suero	24 hrs
	M.I.F.	Determinación de inmunidad celular	10 ml de sangre completa (EDTA)	48 hrs
	Contrainmunoelectro- resis	Determinación de ac's	5 ml de suero	24 hrs
TUBERCULOSIS	Fijación de complemento	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	48 hrs
	M.I.F.	Determinación de inmunidad celular	10 ml de sangre completa (EDTA)	48 hrs

## CERDOS

ENFERMEDAD	PRUEBA	PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO	MUESTRA O ESPECIMEN	TIEMPO MINIMO DE LA PRUEBA
	Imunodifusión	Determinación de ac's	5 ml de suero	48 hrs
	Inmunofluorescencia	Identificación de virus	Cerebro, médula espinal	2 hrs
	Prueba biológica	Reproducción de la enfermedad	Cerebro, médula espinal	72 hrs
AUESZKY	Seroneutralización en cultivo celular	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	72 hrs
BRUCELOSIS	Combs	Determinación de ac's	5 ml de suero	24 hrs
CISTICERCOSIS	Contrainmunoelectroforesis	Determinación de ac's	5 ml de suero	24 hrs
FIEBRE PORCINA CLASICA	Hemoaglutinación pasiva	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	48 hrs
GET	Inmunofluorescencia	Identificación del virus	Tonsilas, bazo, ganglio linfático	2 hrs
	Inmunofluorescencia	Detección del virus	Intestino delgado (león)	2 hrs
PARVOVIRUS	Inhibición de la hemoaglutinación	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	24 hrs
SINDROME DE OJO AZUL	Cultivo celular	Aislamiento viral		6 días
	Inhibición de la hemoaglutinación	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	24 hrs
	Inmunofluorescencia	Identificación del virus	Encéfalo, tonsilas, pulmón	2 hrs

## EQUINOS

ENFERMEDAD O ESTUDIO	PRUEBA	PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO	MUESTRA O ESPECIMEN	TIEMPO MINIMO DE PRUEBA
ANEMIA INFECCIOSA EQUINA	Coogins	Determinación de ac's	5 ml de suero	48 hrs
BRUCELOSIS	Fijación de complemento	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	48 hrs
	Huddlesson	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	48 hrs
DETERMINACIÓN DE PATERNIDAD	Electroforesis	Determinación de polimorfismo bioquímico de proteínas sanguíneas	10 ml de sangre (EDTA) del producto y de cada uno de los supuestos padres	7 días
ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA	Inhibición de la hemoaglutinación	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	48 hrs
ERITROLISIS NEONATAL	Agglutinación	Determinación de niveles de ac's	10 ml de sangre completa del seminal (EDTA) y 5 ml de suero de hembra	24 hrs

**PERROS Y GATOS**

ENFERMEDAD	PRUEBA	PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO	MUESTRA	TIEMPO MINIMO DE LA PRUEBA
BRUCELOSIS	Fijación de complemento	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	48 hrs
	Hemoaglutinación	Identificación de la presencia del virus	Heces	24 hrs
GASTROENTERITIS HEMORRAGICA POR PARVOVIRUS	Inhibición de la hemoaglutinación	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	24 hrs
	Hemoaglutinación pasiva	Identificación de la presencia del virus	5 ml de suero	
MOQUILLO CANINO	Inmunofluorescencia	Identificación del virus	Impronta de córnea, y/o cerebro	3 hrs
PERITONITIS INFECCIOSA	Precipitación	Determinación de ac's	5 ml de suero	48 hrs
	Inmunofluorescencia	Identificación del virus	Cerebro, cerebelo, glándulas salivales	2 hrs
	Prueba biológica	Detección del virus	Cerebro, cerebelo, glándulas salivales	14 días
	Seller	Detección del virus	Cerebro, cerebelo, glándulas salivales	30 min
	Seroneutralización en ratón lactante	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	21 días
RABIA				
TOXOPLASMOSIS	Fijación de complemento	Determinación de niveles de ac's	5 ml de suero	48 hrs



## ANEXO 2

### LINEAMIENTOS PARA LA INTERPRETACION DE PRUEBAS SEROLOGICAS

La interpretación de los resultados serológicos siempre debe tomar en cuenta los factores que puedan afectar los títulos, y la presencia de infecciones nuevas o recurrentes. Por lo que es necesario registrar y considerar la historia de la vacunación, la edad y el número de parto durante la interpretación.

Al planear las estrategias de muestreo en la interpretación de los resultados de las pruebas serológicas, será necesario considerar algunos factores referentes a enfermedades infecciosas, como por ejemplo:

- La presencia de infecciones subclínicas. Algunas veces no existe una diferencia en la magnitud de la respuesta serológica, en los títulos, entre los animales infectados clínica y subclínicamente.
- Diferencias en la virulencia en los aislamientos de ciertos microorganismos. Las pruebas serológicas, por lo general, no determinan si la infección fue por un microorganismo muy virulento o uno apatógeno.

En una situación interpretativa simple, una prueba positiva en un solo animal significa que este animal se ha expuesto previamente al antígeno (agente infeccioso o vacuna). Pero no significa que el animal esté infectado en ese momento con dicho agente infeccioso. La confianza que se puede depositar en un resultado positivo o negativo depende de:

- Si la prueba es altamente específica se puede tener confianza de un resultado positivo.
- Si la prueba es altamente sensible puede tenerse confianza cuando aparezca un resultado negativo .

A partir de un título de anticuerpos en una sola muestra de suero de un solo animal no se puede determinar mucho, ni obtener información útil; solo si el animal es positivo o negativo. Una excepción es cuando la prueba mide predominantemente IgM (aglutinación, fijación del complemento, inmunofluorescencia indirecta específica para IgM, o ELISA). Debido a que la respuesta inmune con IgM es de desarrollo y declinación rápidos, la presencia de altos títulos infiere un contacto reciente con el antígeno ( de 1 a 5 semanas de exposición). Por ejemplo, si ocurren abortos durante la última etapa de la gestación, en casos en que se haya efectuado la vacunación contra la leptospirosis antes del servicio, la presencia de títulos elevados ( > - 1:400) en una prueba de microaglutinación, sugiere una infección reciente.



Los títulos de un solo muestreo de suero a partir de varios animales con historias clínicas similares solo dan una estimación de la seroprevalencia hacia el antígeno.

Generalmente existe suficiente variación de los resultados dentro de un grupo que la interpretación es todavía más difícil que cuando se trata de un solo animal. A excepción de cuando todos los animales tienen títulos sumamente altos.

Los resultados de las muestras de sangre paralelas o seriadas de uno o más animales son los más fáciles de interpretar y por lo general, los que tienen más significado. Un incremento de 4 veces o más en el título (por ejemplo de 1:4 con aumento a 1:16) de una muestra en fase aguda a otra en la etapa de convalecencia, sugiere una exposición muy reciente a un antígeno y considerada con los hallazgos clínicos se puede emplear con fines diagnósticos.

Cuando se tiene grupos de animales y se toman muestras seriadas de sangre, los resultados de las pruebas serológicas pueden dar un panorama muy claro de infección temporal de poblaciones de animales con muchos agentes infecciosos.

Si se combinan con observaciones muy cuidadosas de las condiciones clínicas y con los datos del rendimiento, las muestras de sangre de estos animales se pueden utilizar para establecer relaciones entre dichos datos y la seroconversión a diferentes agentes, pudiendo efectuar comparaciones.

- Consideraciones sobre un resultado positivo

Un resultado positivo no necesariamente implica que el animal esté infectado por un agente. Puede deberse a una vacunación previa, a inmunidad pasiva por el calostro o a reacciones cruzadas con otros agentes infecciosos.

Con las pruebas de alta sensibilidad y especificidad como ELISA competitivo, se obtienen resultados falsos positivos con sueros contaminados, por errores de manejo de la muestra o de algún paso en el desarrollo de la técnica.