

**NOM-056-ZOO-1995**

**NORMA OFICIAL MEXICANA, ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS QUE REALICEN LOS LABORATORIOS DE PRUEBAS APROBADOS EN MATERIA ZOOSANITARIA.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

JORGE MORENO COLLADO, Director General Jurídico de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, con fundamento en los artículos 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, 4o. fracciones I, III y V, 12 fracción VIII, 13 y 16 de la Ley Federal de Sanidad Animal; 1o., 38 fracción II, 40 fracciones III y XI, 41 y 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 12 fracciones XXIX y XXX del Reglamento Interior de esta Dependencia, y

**CONSIDERANDO**

Que es atribución de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, fomentar la producción pecuaria mediante la aplicación de las medidas zoonosanitarias tendientes a prevenir, controlar y erradicar enfermedades y plagas de los animales, con la finalidad de proteger la salud de éstos y la del hombre.

Que los servicios de diagnóstico que realizan los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria, contribuyen a resguardar la realización de los programas sanitarios.

Que las pruebas diagnósticas que realizan los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria, deben estar debidamente reguladas con la finalidad de proporcionar a los usuarios un servicio de calidad.

Que se requiere homologar los procedimientos técnicos de las pruebas diagnósticas que realizan los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria a fin de que garanticen su repetibilidad y reproducibilidad.

Que para alcanzar los objetivos señalados en los párrafos anteriores, con fecha 13 de octubre de 1997 se publicó en el **Diario Oficial de la Federación**, el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995, Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria, iniciando con ello el trámite a que se refiere la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; razón por la cual, con fecha 1 de julio de 1998 se publicaron las respuestas a los comentarios recibidos en relación a dicho proyecto.

Que en virtud del resultado del procedimiento legal antes indicado, se modificaron los diversos puntos que resultaron procedentes y por lo cual, se expide la presente Norma Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995, Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

**INDICE**

- 1.- Objetivo y campo de aplicación
  - 2.- Referencias
  - 3.- Definiciones y abreviaturas
  - 4.- Disposiciones generales
  - 5.- Identificación de abejas africanas
  - 6.- Varroasis de las abejas
  - 7.- Enfermedad de Newcastle
  - 8.- Influenza aviar
  - 9.- Salmonelosis aviar
  - 10.- Diagnóstico taxonómico de garrapatas
  - 11.- Brucelosis bovina y caprina
  - 12.- Rabia
  - 13.- Tuberculosis bovina
  - 14.- Enfermedad de Aujeszky
  - 15.- Fiebre porcina clásica
  - 16.- Sanciones
  - 17.- Concordancia con normas internacionales
  - 18.- Disposiciones transitorias
- 1. Objetivo y campo de aplicación**

**1.1.** La presente Norma es de observancia en todo el territorio nacional y tiene por objeto establecer las especificaciones técnicas de las pruebas diagnósticas que deben observar los laboratorios de pruebas en materia zoonosanitaria que sean aprobados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

**1.2.** La vigilancia del cumplimiento de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural y a los gobiernos de los estados en el ámbito de sus respectivas circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos que se suscriban.

**1.3.** La aplicación de las disposiciones previstas en esta Norma compete a la Dirección General de Salud Animal, así como a las delegaciones estatales de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales.

## **2. Referencias**

Para la correcta aplicación de esta Norma se deben consultar las siguientes normas oficiales mexicanas:

NOM-001-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Varroasis de las Abejas.

NOM-002-ZOO-1994, Actividades técnicas y operativas aplicables al programa nacional para el control de la abeja africana.

NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

NOM-005-ZOO-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar.

NOM-007-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky.

NOM-013-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Newcastle, presentación velogénica.

NOM-019-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus* spp.

NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).

NOM-037-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica.

NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.

NOM-011-SSA2-1993, Norma Oficial Mexicana para la Prevención y Control de la Rabia.

## **3. Definiciones y abreviaturas**

Para efectos de la presente Norma se entiende por:

**3.1. Abeja:** insecto himenóptero *Apis mellifera* sp.

**3.2. Abeja africanizada:** es el insecto conocido como *Apis mellifera* en cualquier forma de desarrollo y que incluye características genéticas de las especies africana y europea.

**3.3. Abeja obrera:** abeja hembra reproductivamente incompleta.

**3.4. Abeja reina:** es la abeja hembra sexualmente desarrollada, cuya función principal es depositar huevos fértiles en las celdas del panal y regir la vida de la colonia.

**3.5. Aislamiento viral:** prueba diagnóstica realizada por un laboratorio aprobado para la Campaña Nacional contra la Enfermedad de Newcastle, consiste en la inoculación de muestras procedentes de aves en embrión de pollo, para el aislamiento e identificación del virus de la enfermedad de Newcastle.

**3.6. Alojamiento para animales en proceso de pruebas:** local dedicado exclusivamente para la permanencia temporal de animales de laboratorio u otras especies animales empleados en desarrollo de pruebas y/o análisis, el cual debe cumplir con los requisitos necesarios para un trato humanitario.

**3.7. Análisis:** operación técnica que consiste en la determinación de una o varias características de un producto, proceso o servicio, con base en un procedimiento específico.

**3.8. Anaplasmosis:** enfermedad infecciosa no contagiosa del ganado, caracterizada por anemia progresiva, fiebre e ictericia y en ocasiones abortos y muerte en los animales, ocasionada por *Anaplasma marginale*, rickettsia que es transmitida por artrópodos como moscas, mosquitos, tábanos, garrapatas, o bien, por objetos contaminados como instrumental de cirugía y agujas.

**3.9. Anticuerpos:** son inmunoglobulinas formadas en respuesta a la introducción de sustancias que, una vez dentro del organismo, son reconocidas por éste como exógenas. Su propiedad característica es que se cambian en condiciones fisiológicas, con la sustancia que indujo su formación.

**3.10. Antígeno:** sustancia que puede inducir una respuesta inmunitaria.

**3.11. Antígeno K polivalente:** producto biológico constatado y autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, utilizado para la detección serológica de aves portadoras de Púlorosis (*S. pullorum*) y Tifoidea Aviar (*S. gallinarum*) a nivel de campo, compuesto por las siguientes cepas:

cepa intermedia - 4

cepa estándar - 11

cepa variante - 77  
cepa variante - 79  
cepa variante - 269

**3.12. Apiario:** es el conjunto de colmenas instaladas en un lugar determinado.

**3.13. APSP:** prueba de aglutinación rápida en placa (con sangre completa) para *S. pullorum* y *S. gallinarum*.

**3.14. Babesiosis:** enfermedad parasitaria del ganado causada por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, transmitida por garrapatas del género *Boophilus*, que infecta a los eritrocitos, manifestada por anemia, ocasionalmente hemoglobinuria y fiebre. En casos agudos se presenta muerte súbita y en algunas ocasiones signos nerviosos.

**3.15. Boophilus:** garrapata de un hospedero, transmisor de la babesiosis y anaplasmosis a los animales domésticos y silvestres. Existen cinco especies reconocidas a nivel mundial de las cuales *boophilus microplus* (*B. microplus*) y *Boophilus annulatus* (*B. annulatus*) están distribuidas en México, encontrándose de manera simultánea en la región centro sur. *B. microplus* se encuentra con mayor frecuencia y abundancia en las zonas tropicales bajas, donde coexisten con *Amblyomma cajennense*; *B. annulatus* soportan menor temperatura y humedad y se localizan en la parte norte del país principalmente en el norte de Sinaloa, Coahuila, Nuevo León, Baja California, Durango y Jalisco.

**3.16. Bastidor:** marco y/o cuadro de madera con alambres sobre el cual se fija la cera estampada para la formación del panal.

**3.17. Cadáver:** cuerpo de un organismo animal después de su muerte.

**3.18. Campañas:** las campañas nacionales establecidas a través de las normas oficiales mexicanas.

**3.19. Cepas de alta patogenicidad:** son aquellas cepas de virus de la Influenza Aviar, que inoculadas mediante fluido alantoideo o cultivo celular en ocho pollos susceptibles (libres de patógenos específicos) de cuatro a ocho semanas de edad, causan una mortalidad por lo menos el 75% de las aves dentro de ocho días subsecuentes a la inoculación de las mismas.

**3.20. Cepas de baja patogenicidad:** son aquellas cepas de virus de Influenza Aviar, que inoculadas mediante fluido alantoideo en ocho susceptibles (libres de patógenos específicos) de cuatro a ocho semanas de edad infectados con fluido alantoideo o cultivo celular, pueden causar una mortalidad menor al 75% de las aves dentro de ocho días subsecuentes a la inoculación de las mismas.

**3.21. Colmena:** alojamiento de una colonia o familia de abejas.

**3.22. Constancia de resultados de pruebas o análisis:** documento que presenta los resultados obtenidos de las pruebas y/o análisis realizados y otra información relevante derivada de los mismos.

**3.23. Dirección:** la Dirección General de Salud Animal.

**3.24. Desinfección:** utilización de medios físicos o químicos para la destrucción de microorganismos o gérmenes.

**3.25. EA:** enfermedad de Aujeszky.

**3.26. NC:** enfermedad de Newcastle.

**3.27. ENV:** enfermedad de Newcastle presentación velogénica.

**3.28. Enfermedades transmitidas por garrapatas:** la babesiosis y la anaplasmosis.

**3.29. Enfermedad de Aujeszky, también conocida como pseudorrabia:** enfermedad infectocontagiosa de origen viral, altamente transmisible, que afecta principalmente a los porcinos, ocasionando disminución en la fertilidad, abortos, mortinatos, signos respiratorios en cerdos en crecimiento, así como alta mortalidad de cerdos jóvenes y de otras especies susceptibles.

**3.30. Equipo para laboratorio de pruebas:** conjunto de aparatos y/o instrumentos mecánicos, eléctricos, mecánico-eléctricos y/o computarizados que son utilizados para llevar a cabo algunos procedimientos de pruebas o la totalidad de éstas.

**3.31. Esterilización:** procedimiento que tiene por objeto la destrucción total de microorganismos, que se puede llevar a cabo por métodos físicos o químicos. Debe ser verificado por pruebas de esterilidad apropiadas para cada caso.

**3.32. Fluido:** sustancia líquida o gaseosa que por sus características fisicoquímicas no tiene forma propia, sino que adoptan la del producto que las contienen.

**3.33. Fiebre Porcina Clásica, antes denominada "Cólera Porcino":** enfermedad altamente contagiosa, causada por un virus de la familia togaviridae, de curso generalmente agudo, pero que puede tener una presentación atípica. En la presentación típica los cerdos pueden presentar anorexia, fiebre de 41°C o más, temblores musculares, postración, constipación intestinal que alterna con periodos de diarrea, secreción mucopurulenta en los ojos y eritema en la piel. En los estudios finales de la enfermedad puede observarse trastornos nerviosos, parálisis y por último la muerte.

**3.34. FPC:** fiebre Porcina Clásica.

**3.35. Infestación:** es la presencia de garrapatas o ectoparásitos en los animales.

**3.36. Laboratorio aprobado:** laboratorio reconocido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural para realizar pruebas o análisis específicos en materia zoonosanitaria.

**3.37. Laboratorio de pruebas o análisis:** aquella instalación que opera en una localidad específicamente determinada, que dispone del equipo necesario y el personal calificado para efectuar pruebas y análisis en materia zoonosanitaria.

**3.38. Método de prueba o análisis:** procedimiento técnico específico para la realización de una prueba o análisis.

**3.39. Muestra:** espécimen que representa las características de un todo.

**3.40. Muestras:** sangre, suero, tejidos, órganos, leche y lacticinios u otros que se relacionen con la Brucelosis y que sean definidos por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, con el propósito de ser analizados mediante pruebas de diagnóstico para identificar la presencia de la enfermedad.

**3.41. Panal:** estructura formada por celdas de cera, que sirven como depósito de alimentos o que aloja crías.

**3.42. Parásito:** organismo que vive a expensas del hospedero del cual obtiene protección y sustento. Vive en el interior o sobre la superficie del individuo que lo alberga.

**3.43. Precipitación:** es una reacción de identificación que conserva unidas las moléculas solubles de antígeno por acción de los anticuerpos; lo cual produce un precipitado visible, que contiene tanto el antígeno como el anticuerpo.

**3.44. Parvada:** conjunto de aves, para fines de esta Norma se consideran aquellas de aves progenitoras o reproductoras.

**3.45. Prueba:** procedimiento para identificar un constituyente, descubrir cambios de una función o establecer la naturaleza verdadera de un trastorno.

**3.46. Reactivo:** sustancia empleada para producir una reacción o descubrir la presencia de otra sustancia.

**3.47. Repetibilidad y reproducibilidad de pruebas o análisis:** concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma muestra, efectuadas con la aplicación de la totalidad de las condiciones siguientes:

Mismo método de prueba o análisis.

Mismas características del instrumento de medición.

Mismas condiciones de uso.

Repetición en periodos cortos.

Misma muestra.

**3.48. Salmonelosis Aviar:**

Enfermedad bacteriana contagiosa, cuyos agentes causales son *S. pullorum* que produce la Pulorosis y *S. gallinarum* que produce la Tifoidea Aviar.

**3.49. Secretaría:** la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

**3.50. Taxonomía:** clasificación sistemática de los seres vivos, basándose en las diferencias que existen entre ellos.

**3.51. UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.

**3.52. Varroasis:** enfermedad parasitaria externa de las abejas ocasionada por el ácaro *Varroa jacobsoni*.

**3.53. Zángano:** abeja macho.

#### **4. Disposiciones generales**

Los laboratorios de pruebas en materia zoonosanitaria dedicados al diagnóstico tendrán reconocimiento oficial de la Secretaría, en aquellas técnicas en que demuestren su capacidad operativa conforme a los dictámenes del Comité de Evaluación para la Aprobación de Laboratorios de Pruebas en Materia Zoonosanitaria.

De conformidad con las disposiciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, "Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria", los laboratorios de pruebas en materia zoonosanitaria deben emplear los métodos y procedimientos prescritos en esta Norma Oficial Mexicana, de acuerdo a las pruebas y/o análisis para la cual el laboratorio fue aprobado.

#### **5. Identificación de abejas africanas**

Título

Identificación taxonómica de abejas africanizadas.

Objetivo

Diagnóstico morfométrico de abejas melíferas africanizadas mediante técnicas microscópicas y computarizadas.

Campo de aplicación

El método es utilizado para el diagnóstico de africanización en enjambres de abejas melíferas, en apiarios y en la certificación de criaderos de abejas reinas.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-002-ZOO-1994, Actividades técnicas y operativas aplicables al programa nacional para el control de la abeja africana.

Generalidades

A partir de la introducción de la abeja africana en México, se estableció la metodología para el diagnóstico de africanización de abejas en diversos laboratorios de morfometría en nuestro país. Actualmente la determinación se realiza para certificar criaderos de reinas como 100% europeas o determinar el grado de hibridismo en una colonia. El diagnóstico se realiza por los métodos denominados Fabis y Daily.

Equipo e instrumentos

- 1.- Computadora PC-AT 286 o superior.
- 2.- Estufa bacteriológica.
- 3.- Micrómetro en marco para diapositiva.
- 4.- Microscopio estereoscópico.
- 5.- Platina.
- 6.- Proyector de diapositivas.
- 7.- Proyector para microscopio compuesto.
- 8.- Ratón digitalizador para computadora.

Materiales

- 1.- Caja de Petri.
- 2.- Crisol de porcelana.
- 3.- Cubreobjetos 24 x 40 mm.
- 4.- Gotero.
- 5.- Papel secante.
- 6.- Pincel de cerda fina.
- 7.- Pinzas de punta fina.
- 8.- Portaobjetos.
- 9.- Regla de plástico transparente de 50 cm.
- 10.- Monturas para diapositiva.
- 11.- Placa de porcelana con excavaciones.

Reactivos

- 1.- Agua destilada
- 2.- Alcohol 70%
- 3.- Fucsina básica 2%
- 4.- Hidróxido de potasio 10%

Condiciones ambientales

Las regulares de un laboratorio de pruebas.

Preparación y acondicionamiento de la muestra.

La muestra de abejas una vez recibida en laboratorio e identificada, se retira del frasco contenedor y se procede a realizar el diagnóstico.

Procedimiento

El procedimiento para el diagnóstico de africanización puede ser de Fabis I, Fabis II y Daily y su aplicación depende de los resultados encontrados en cada uno de ellos dando inicio siempre por Fabis I.

1.- Fabis I

Se toman diez abejas y se depositan sobre un papel secante, el cual absorberá el líquido conservador sobrante.

Se toma con cuidado una abeja y se desprende el ala anterior izquierda (vista dorsal) desde la base del ala (microscopio), procurando no romper o desgarrar el ala. Esto se facilita si se utilizan dos pinzas de punta fina (pinzas de relojero). Una para sujetar la región del tórax y la otra para desprender el ala.

Para comprobar que las alas han sido bien desprendidas se observan en un microscopio estereoscópico y debe apreciarse claramente la canaladura de la vena costal del ala y la parte distal del borde del ala completa. Cuando un ala esté mal desprendida o rota se desecha y se toma la del lado derecho.

Se toman las diez alas delanteras izquierdas ya desprendidas, completas y bien diseccionadas. Se montan sobre un cubreobjetos de 24 X 40 mm, éste se cubre con un segundo cubreobjeto, y se pega con diúrex por la parte angosta, ésta debe de quedar en forma de bisagra.

Las alas deben tener la misma orientación procurando que queden lo más pegadas ocultas posible y también intercaladas para que cuando se tomen las medidas la última no quede muy abajo, también se puede colocar en los dos

cubres cinco alas por cubre lo cual quita más tiempo y material. Se sellan en los extremos con diúrex y se enmarcan en una montura o marco para diapositivas. Estas molduras pueden ser de cartón o plástico.

Las monturas deben llevar el número del caso o muestra.

Previo a la lectura del tamaño de las alas se realiza el ajuste del proyector que consiste en:

Se fija el lente micrométrico en un cubreobjetos, y se monta en una montura.

La montura con el ocular micrométrico se proyecta en la pared. La proyección en la pared se mide con una regla de cincuenta centímetros hasta que el centímetro proyectado del ocular milimétrico, equivalga a los cincuenta centímetros; si se ajusta a 50 cm, el resultado de las medidas se multiplica por dos.

El ajuste, se puede hacer acercando o retirando el proyector de la pared. El proyector no debe moverse o la lectura resultará falsa y de ser posible se deberá fijar por algún medio. Cuando el ajuste esté terminado se monta la primera muestra.

Teniendo la primera diapositiva con las diez alas se procede a efectuar las mediciones. Para ello se coloca la regla en el centro de la canaladura de la vena costal, y se traza una línea recta hasta la parte más distal del ala, se mide la distancia se va anotando el resultado, y se procede con las mediciones de las restantes diapositivas.

Cuando se tienen las mediciones de las cinco o diez alas, se introducen éstas en el programa de computadora previamente cargado según se indica en fórmulas para el cálculo de resultados.

Si el resultado del análisis es dudoso, las muestras deben trabajarse para realizar el segundo nivel de complejidad, que es en este caso Fabis II.

### **2.- Fabis II**

Este método consiste en el desprendimiento cuidadoso del tercer par de patas de las abejas, teniendo en cuenta que se tomaron estas estructuras de un solo lado y se tendrá como complemento la elaboración del Fabis I.

Una vez desprendidas las estructuras para el Fabis I se procederá a tomar las mismas diez abejas para el desprendimiento del tercer par de patas, teniendo como ayuda unas pinzas de relojero de punta fina.

Ya desprendidas las patas se hace una separación de ésta, eliminando la coxa y el trocánter, quedando la tibia y el fémur que son los segmentos principales que nos interesa en este caso.

Los segmentos bien definidos se colocan ordenados en un trozo de diúrex unido a un cubreobjetos de 24 X 42 mm, para luego ser fijados totalmente en el cubreobjetos.

Montadas las estructuras se procede a hacer la medición de igual forma que en el Fabis I. Los datos resultantes de este procedimiento se introducen en el programa de computadora como en el caso anterior.

### **3.- Daily**

Las muestras deben conservarse en alcohol al 70%. Se toma una abeja y se desprende con la ayuda de unas pinzas desde la base del ala anterior, ala posterior, tercer pata posterior (no importa el lado, siempre y cuando sean todas las estructuras del mismo lado) y el tercer esternito abdominal, todas las partes se colocan en una caja Petri con alcohol al 70%.

En el microscopio estereoscópico se hace un corte inclinado en el ala anterior con el bisturí de tal forma que no cortemos la canaladura de la vena costal del ala, posteriormente se hace un corte a la ala posterior en línea recta antes de la línea de unión.

Se desprende una pata posterior, los segmentos V, IV, III y II, del tarso, estas piezas se desechan. Se desprende el primer segmento del tarso, si queda adherido algo de tejido muscular se corta con el bisturí.

Se desprende la coxa y el trocánter con mucho cuidado, tratando de no cortar la parte terminal del fémur.

Al tercer esternito abdominal se le quita el tejido que tiene adherido con la ayuda de un pincel fino, tratando de no rasgar los espejos.

Al ala posterior se le corta con el bisturí la base. El esternito se coloca en un crisol de porcelana con 10 ml de hidróxido de potasio al 10%, se pone a calentar en una platina y cuando empieza a hervir se retira y se deja enfriar.

Se lava perfectamente con agua destilada para quitar el exceso de hidróxido de potasio.

Se coloca el esternito en una placa de porcelana con excavaciones y se le agregan unas gotas (hasta cubrirlo) de fucsina básica al 2%. Se tapa con una placa de vidrio y se deja teñir durante 20 minutos. Se le quita el exceso de colorante con alcohol al 70%, si es necesario se deja un poco más de tiempo, se pone a secar en el papel secante.

Se montan en el portaobjeto en un extremo se ponen seis gotas de bálsamo de Canadá para colocar el fémur y la tibia (bien dobladas) y posteriormente el basitarso colocando el cubreobjetos de 22 X 22 tratando que quede perfectamente adherido sin que se arruguen ni se doblen los espejos y que no se formen bolsas de aire.

En el mismo portaobjetos se acomodan el ala anterior posterior el tercer esternito (las partes blandas). El fémur y la tibia (partes duras) se cubren con bálsamo de Canadá y se coloca un cubreobjetos tratando de que no se formen burbujas. Se pone a secar en una estufa a 40 grados centígrados durante 24 horas.

Si alguna parte no está completa o durante la disección se desgarran, se desechan todas las demás partes de esta abeja y se repite el procedimiento con una nueva abeja de la muestra.

Se debe tener cuidado al manejar varias muestras de no mezclar parte de una abeja con otra. Los crisoles, cajas de Petri y las placas de tinción con excavaciones, se deben marcar con el número de la muestra respectiva con la que se está trabajando en este momento se debe usar un crisol, una caja de Petri y una placa de tinción con excavación por abeja.

Una vez que se ha preparado el portaobjetos con las estructuras, se debe identificar marcando la orilla de la laminilla con el mismo número que posee la muestra original.

Para inicio de las lecturas deberá prepararse la computadora personal, la cual está conectada al ratón digitalizador y recibe las señales de la estructura de la abeja que se está midiendo.

La computadora deberá cargarse con el programa en BASIC que permite realizar las lecturas y analizar los datos.

Se monta la preparación en la platina del microscopio y se hace pasar el haz de luz proyectándose la preparación en la tabla o base del microscopio de proyección. La medición se realiza digitalizando sobre la proyección en la tabla con el ratón digitalizador los puntos a continuación en el siguiente orden:

a) Largo del ala anterior (figura 1) en sus estructuras de la canaladura hacia la parte distal (puntos 1 y 2), ancho del ala comenzando de adelante hacia atrás (puntos 3 y 4).

b) Largo del ala posterior midiendo (figura 2) desde la primera vena hasta la parte distal (puntos 5 y 6), ancho del ala posterior (puntos 7 y 8).

c) Contar los hamulos (cerdas) del ala anterior e introducir el número en la computadora (figura 2).

d) Digitalizar el sitio donde aparecen los ángulos del ala anterior (figura 1) en el orden indicado de mayor a menor (10 a 23).

e) Pata posterior derecha (figura 3) medir el largo de la tibia (puntos 24 y 25). Medir el largo del fémur en la misma figura (puntos 26 y 27).

f) Basitarso posterior derecho (figura 4) medir el largo del basitarso (puntos 28 y 29). Medir el ancho del basitarso (puntos 30 y 31)

g) Tercer esternito abdominal (figura 5). Ancho del esternito (puntos 32 y 33). Ancho de los espejos (puntos 34 y 35). Largo del espejo (puntos 36 y 37). Distancia entre los espejos (puntos 38 y 39).

Las mediciones anteriores se realizan en las 10 muestras preparadas.

Al término de la décima lectura aparece en pantalla la pregunta si se desea introducir más información. Al escribir que no, se introducen posteriormente datos de identificación de la muestra.

Como aspecto final en el programa aparece en pantalla la probabilidad de africanización.

Fórmulas para el cálculo de resultados

Todos los cálculos son realizados por computadora, sin embargo, ellos son medias del tamaño de las estructuras analizadas y cálculo de Desviaciones estándar.

El análisis estadístico de probabilidad de africanización tanto en Fabis I y II como en Daily, se obtiene mediante el programa de computadora en BASIC para el diagnóstico morfométrico proporcionado por el Programa Nacional para el Control de la Abeja Africanizada o por el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal.

Interpretación de los resultados

Escalas comparativas

Z = Es mayor o igual a cero

EUROPEA

Z = Entre - 0.1 a - 2.9

SOSPECHOSA

Z = Es menor de -3.0 y hasta -6.0

AFRICANA

Indices de reproductibilidad y repetibilidad

Superior al 95%

Bibliografía

Milne, P.S. 1948. Acarine Disease of Bees. J. Minist. Agric. Fish. 54:473-377.

Título

Diagnóstico de la acariosis traqueal en abejas melíferas

Objetivo

Detectar la presencia del ácaro traqueal *Acarapis woodi* en abejas melíferas.

Campo de aplicación

Diagnóstico de ácaros traqueales en abejas reinas sujetas a certificación para movilización en México.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-002-ZOO-1994, Actividades técnicas y operativas aplicables al programa nacional para el control de la abeja africana.

Generalidades

La técnica para la detección de la acariosis traqueal de las abejas fue desarrollada por el British Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, en 1956, y es la empleada, con algunas modificaciones por el USDA, debido a que es un método sencillo, requiere un mínimo de destreza y tiempo, unos 30 a 60 s. por abeja, es económica, por requerir de un mínimo de equipo, tiene la ventaja de que se pueden examinar las abejas individualmente, ya que el grado de infestación puede diferir considerablemente entre las abejas de una colmena, y logra detectar infestaciones iniciales, al extraer la tráquea protorácica y su inserción con el primer par de espiráculos torácicos, lo cual asegura la visualización de cualquier ácaro que se pudiera encontrar en la entrada de las tráqueas.

Equipo e instrumentos

- 1.- Lámpara de restirador
- 2.- Microscopio estereoscópico

Materiales

- 1.- Agujas de disección
- 2.- Lápiz graso
- 3.- Pinzas de disección de punta fina o de relojero
- 4.- Portaobjetos

Reactivos

Acido láctico

Condiciones ambientales

De laboratorio no se requieren medidas de bioseguridad.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Se deberá solicitar al remitente que se muestree el 10% de las colmenas. De cada colonia o colmena es recomendable tomar en un frasco correctamente identificado con el nombre del apiario y número de la colmena unas 10 abejas por cajón, colectadas preferentemente de la piquera, lo cual garantizará incluir abejas adultas de edad homogénea. El frasco de colecta deberá contener alcohol al 70% como preservador.

Procedimiento

- 1.- Se sostiene a la abeja por el abdomen, con los dedos pulgar e índice (figura 1).
- 2.- Con unas pinzas de punta muy fina (de relojero), se desprenden la cabeza y el primer par de patas, para exponer el mesotórax.
- 3.- Con los dedos lateralmente, se ejerce una ligera presión hacia adelante del tórax, a manera de incluir el tejido asociado con el sistema traqueal.
- 4.- Con las pinzas se desprenden el primer anillo torácico de quitina, donde se localizan las tráqueas, cuidando de no romperlo.
- 5.- Con las pinzas se coloca el anillo torácico en un portaobjetos, repitiendo la misma operación, con objeto de incluir hasta cinco anillos torácicos en un mismo portaobjetos, lo cual agiliza la observación.
- 6.- Se agrega una gota de ácido láctico, a cada anillo torácico, para aclarar el tejido y hacer visibles las tráqueas. Dejar transcurrir uno a dos minutos -tiempo requerido para desprender los cinco anillos restantes-, el ácido láctico ya aclaró el tejido y las tráqueas son fácilmente visibles. Coloque el portaobjetos bajo el microscopio de disección, utilice el lente de menor aumento (10X).
- 7.- Con ayuda de dos agujas de disección, se separan hacia un lado, con cuidado, las tráqueas del anillo de quitina. Desde este momento ya es posible determinar si las tráqueas están infestadas. Examine el aspecto de las tráqueas y observe si hay ácaros, en especial cerca del orificio estigmático. Si éstos existen el diagnóstico será positivo.

Fórmulas de cálculo para resultados:

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados.

El diagnóstico e identificación positivo, lo constituye la presencia de ácaros en las tráqueas (Figura 2), ya que *Acarapis woodi*, es el único ácaro traqueal de las abejas. Las tráqueas sanas presentan el aspecto de cordones blanco-nacarados flexibles y transparentes. Cuando encontramos la tráquea sin ácaros, pero existen ligeras manchas color ocre o negras, en la misma, es indicio de que estuvo parasitada, sin embargo, el diagnóstico positivo es la localización del ácaro en las tráqueas.

El reporte del diagnóstico puede expresarse en términos de:

Negativa o infestación nula = cero ácaros.

Positiva = cuando se encuentre el ácaro en cualquier tráquea o tráquea necrosada.

En caso de que se desee conocer el porcentaje de infestación de las abejas, en base al número de ácaros encontrados en ambas tráqueas, se pueden designar rangos de infestación de acuerdo a la región y el clima. Algunos rangos señalan infestación nula = cero ácaros; baja = menos de 15 ácaros y alta = más de 15 ácaros o tráquea necrosada.

Índices de reproducibilidad y repetibilidad

Superior al 95% esperando con cuidado la clarificación de las muestras en el ácido láctico.

Bibliografía

Bailey, L. (1981) Honey Bee Pathology. Academic Press, Londres.

Título

Diagnóstico de la Nosemiasis de las abejas melíferas.

Objetivo

Detección de esporas de *Nosema apis* mediante el examen microscópico en abejas melíferas.

Campo de aplicación.

Esta técnica tiene aplicación en abejas melíferas y es en especial utilizada para la detección de esporas de *Nosema* en abejas reinas en movilización sujetas a la certificación sanitaria.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-002-ZOO-1994, Actividades técnicas y operativas aplicables al Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana.

Generalidades

El agente causal de la Nosemiasis, *Nosema apis* es un parásito microscópico del *Phylum Protozoa*, que se caracteriza por la formación de esporas que son estadios de resistencia del parásito. Las esporas de *Nosema apis* son corpúsculos ovalados de aproximadamente 4 a 6 micras de largo por 2 a 4 de ancho. En el interior de la espora existen dos núcleos y un filamento. Este filamento lleva el nombre de filamento polar y es 70 veces más largo que la espora. El tiempo de viabilidad de las esporas depende de las condiciones a las cuales son expuestas, pueden permanecer viables por muchos meses en heces secas sobre los panales de cría, pero pierden su viabilidad en pocos días si son expuestas a la luz solar.

Las esporas son fácilmente destruidas por calentamiento o por la acción de fumigantes específicos, pero resisten temperaturas inferiores a 10 grados centígrados por varios años.

Equipo e instrumentos

- 1.- Cámara de Neubauer
- 2.- Microscopio compuesto con objetivos 10, 40 y 100X

Materiales

- 1.- Asa bacteriológica
- 2.- Cubreobjetos 18 x 18
- 3.- Gotero
- 4.- Mortero de porcelana
- 5.- Pinzas de punta fina o de relojero
- 6.- Portaobjetos
- 7.- Tamiz de .044 mm.
- 8.- Tijeras
- 9.- Vaso de precipitado de 500 ml.

Reactivos

Agua destilada

Condiciones ambientales

Las regulares de un laboratorio de pruebas.

Preparación y acondicionamiento de la muestra.

La muestra de abejas una vez recibida en laboratorio e identificada se retira del frasco contenedor y se procede a su diagnóstico.

Procedimiento

El diagnóstico de esta enfermedad de las abejas se basa en la detección de la espora que se presenta en insectos infectados, mismo que puede realizarse mediante un método práctico y sencillo denominado examen rápido o bien mediante el método de Cantwell.

a) Examen rápido:

Un examen rápido puede ser hecho removiendo el intestino de la abeja enferma, observando si está distendido y haciendo en seguida un frotis de su contenido directamente en un portaobjetos con una gota de agua. Otro examen más complejo puede ser hecho de acuerdo con la técnica de Cantwell.

b) Método de Cantwell:

Tomar 25 abejas de cada muestra y colocarlas sobre un papel absorbente para que se sequen. Separar los abdómenes de las abejas con una tijera y colocarlos en un mortero con pistilo que contenga 1 ml de agua destilada por abeja, o sea un total de 25 ml. Iniciar el macerado con cerca de 5 ml y agregar hasta 20 ml más de agua posteriormente, con ello se logrará un buen macerado. Tanto el mortero como el pistilo deben estar bien limpios antes del uso. Al finalizar el macerado se tamiza la suspensión lograda con un tamiz de .044 mm, recibiéndolo en un vaso de precipitado.

El frotis se prepara colocando sobre el portaobjetos una gota de la suspensión filtrada. Colocar un cubreobjetos sobre la gota de la suspensión.

Examinar el frotis en un microscopio con aumento de por lo menos 400X. Las esporas de *Nosema apis* son fácilmente vistos por ser corpúsculos brillantes y muy refringentes. Las esporas son ovaladas y miden 4 a 6 micrones de largo por 2 a 4 micras de ancho.

El conteo de las esporas se puede realizar mediante dos métodos. El primero es una modificación del método de conteo de glóbulos rojos en un hemocitómetro, el cual consta de un cubreobjetos y una cámara especial que opera con un volumen específico de fluido antes del uso, la cámara debe estar bien limpia en agua con detergente y se enjuaga con agua corriente, luego se pasa en alcohol etílico. Finalmente se seca con una franela limpia.

Agitar bien la suspensión con el pistilo; se toma un poco con un gotero de la misma y se coloca una gota bajo el cubreobjetos del hemocitómetro hasta llenar por capilaridad. Se debe tener cuidado de llenar únicamente la cámara de hemocitómetro.

Para asegurar la cantidad exacta de líquido que se requiere, también se debe asegurar la ausencia de burbujas bajo el cubreobjetos. Esperar tres minutos para permitir la sedimentación de las esporas antes de iniciar el conteo.

Durante 3 minutos, buscar un área de conteo y enfocar con objetivo de 40X. La cuadrícula de la cámara está dividida en grupos de 16 cuadros y cada grupo está enmarcado por líneas dobles. Se cuentan todas las esporas enmarcadas en las líneas dobles, incluyendo en el conteo a todas las esporas que toquen a las líneas dobles del lado izquierdo y superiores de cada bloque, pero no a las que toquen las líneas dobles inferiores y a las del lado derecho del bloque.

Precauciones que deben tomarse para evitar errores:

- 1.- Agitar la suspensión antes de ser colectada la muestra con el asa de platino, para asegurar una distribución uniforme de las esporas.
- 2.- Flamear el asa antes de ser usada en cada muestra.
- 3.- Usar una cámara para cada muestra.
- 4.- No debe realizarse el conteo si hay burbujas presentes o si existe una distribución poco uniforme de las esporas en la cámara.
- 5.- Permitir la sedimentación de las esporas durante 3 minutos antes de iniciar el conteo.
- 6.- Efectuar el conteo antes de que la muestra empiece a evaporarse de la cámara.

Fórmulas para el cálculo de resultados

Para obtener un buen promedio, se cuentan las esporas de 5 bloques, los 4 de las esquinas y el central de la cámara, totalizando 80 cuadros.

La siguiente ecuación puede ser usada para determinar el número de esporas por abeja.

$$\frac{\text{No. total de esporas contadas en 80 cuadros}}{80} \times 4 \times 10^6 = \text{No. de esporas/abeja}$$

Interpretación de los resultados

- De acuerdo con Jaycox, la severidad de la enfermedad se estima como sigue:

| Intensidad de la infección. | No. de esporas (millones por abeja) |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| NULA                        |                                     |
| MUY LIGERA                  | 0.01 - 1.00                         |
| LIGERA                      | 1.00 - 5.00                         |
| REGULAR                     | 5.00 - 10.00                        |
| SEMISEVERA                  | 10.00 - 20.00                       |
| SEVERA                      | MAS DE 20.00                        |

Indices de reproductibilidad y repetibilidad

Superior al 95%.

#### Bibliografía

- DE Jong D. 1980. *Varroa jacobsoni*, Survey Techniques, Leaflet No. 109, University Of Maryland, U.S.A.  
Guzmán M. E. 1981. Contribución al estudio de la noseemiasis de las abejas. Tesis profesional, México, D.F.  
Jaycox E. R. 1977, Laboratory Diagnosis of Bee Deseases. Publication H-688. University Of Illinois.  
Jaycox E. R. 1980, Estimation of the severity of nosema infection. Unedited bulletin. University of Illinois.  
Shimanuki H. and Cantwell G.E. 1978. Diagnosis Of Honey Bee Deseases Parasites And Pests, USDA. Manual Ar8-me-87. Beltsville Maryland, U.S.A.

### 6. Varroosis de las abejas

#### Título

Diagnóstico de *Varroa Jacobsoni* en abejas melíferas.

#### Objetivo

Diagnóstico del ácaro *Varroa jacobsoni* en *Apis melis* adultas o en crías.

#### Campo de aplicación

La metodología descrita es para ser aplicada en los laboratorios de pruebas que realizan el diagnóstico de enfermedades parasitarias de las abejas y en particular el de *Varroa jacobsoni*.

#### Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-001-ZOO-1994, Campaña nacional contra la varroosis de las abejas.

#### Generalidades

El ácaro *Varroa jacobsoni*, un ectoparásito obligado de las abejas, originalmente confinado a la abeja melífera asiática *Apis cerana*, ha sido diagnosticado recientemente en México. El ácaro en desarrollo se alimenta de hemolinfa de la larva, pupa y abejas adultas, causando el debilitamiento y la mortalidad de las colonias de abejas.

Con objeto de llevar a cabo una detección oportuna de la varroosis, una de las más graves plagas de la apicultura, los apicultores deberán incluir en el examen rutinario de la colmena, una inspección visual detallada de la cría y abejas adultas en busca del ácaro y de los signos de la infestación: abejas con abdomen corto y alas con malformaciones. Uno de los factores que contribuyen a la dispersión de la plaga, es la falta de conocimiento de las mismas, por lo que a continuación se presentan los métodos de diagnóstico comúnmente empleados en otros países.

#### Equipo e instrumentos:

- 1.- Lámpara de restirador
- 2.- Lupa
- 3.- Microscopio estereoscópico

#### Materiales:

- 1.- Aguja de disección
- 2.- Ahumador para colmena
- 3.- Bastidores con malla mosquitero en base al tamaño del piso de la colmena
- 4.- Bolsas de plástico de 30 por 20 cm.
- 5.- Cartulina blanca del tamaño de la colmena
- 6.- Coladera
- 7.- Frasco de vidrio o plástico
- 8.- Navaja o cuchillo
- 9.- Pinza de relojero o pincel No. 2
- 10.- Marcador indeleble
- 11.- Maskin tape de 1 pulgada

#### Reactivos:

- 1.- Alcohol del 70% o Solución con agua jabonosa
- 2.- Vaselina o aceite vegetal
- 3.- Tiras plásticas con fluvalinato o flumetrina

#### Condiciones ambientales

Las regulares de un laboratorio de prueba.

#### Preparación y acondicionamiento de la muestra

No se requiere un acondicionamiento especial, la muestra al recibirse se registra y se expone para su análisis dependiendo de si viene en cartulina, alcohol o panal.

#### Procedimiento

El diagnóstico de *Varroa* se basa en la identificación de la hembra adulta del ácaro la cual es visible a simple vista, sobre las abejas adultas, en las uniones cabeza-tórax-abdomen, entre los segmentos abdominales, y en las celdas de la cría. Los machos y ninfas son más pequeños, de color blanco perlado y no son fáciles de detectar mediante una inspección visual, ya que permanecen dentro de las celdas de la cría operculada.

Existen varios métodos físicos y químicos, para detectar la presencia de *Varroa* en la cría y en las abejas adultas. Para ello se recomienda examinar el 5% de las colmenas del apiario.

a) Examen de la cría operculada:

Se recorta un cuadro de 10 X 10 cm con unas celdas de cría operculada, para extraer la cría y examinarla en busca del ácaro. Si se examina la cría de zánganos, se tienen mayores probabilidades de detectar una infestación baja, debido a la predilección de *Varroa* por ésta. El porcentaje de celdas infestadas se obtiene de dividir el número de celdas examinadas, entre el número de celdas con ácaros y se multiplica por 100.

b) Examen de las abejas adultas por agitación.

Se colectan unas 300 a 500 abejas adultas de la cámara de cría, para someterlas a una agitación durante unos 2 minutos en una solución jabonosa o alcohólica al 70%, y provocar el desprendimiento de los ácaros que se encuentren adheridos a las abejas. Las abejas se separan con una coladera y la solución se filtra con una tela de color blanco, donde se contrastarán fácilmente los ácaros. El porcentaje de infestación de la colmena, se obtiene de dividir el número de ácaros entre el número de abejas examinadas y multiplicado por 100. Se recomienda practicar este examen cada dos meses. Esta técnica permite muestrear grandes cantidades de abejas en corto tiempo y detecta niveles de infestación bajos, debido a que incluye abejas jóvenes y nodrizas, preferidas por *Varroa*.

c) Examen de los detritus de la colmena.

Se recomienda aplicar un tratamiento con un acaricida, para desprender los ácaros que se encuentren adheridos a las abejas adultas. Previo al tratamiento, se coloca en el piso de la colmena, una cartulina blanca con grasa o vaselina para que se adhieran los ácaros, y un bastidor de malla de alambre, para evitar que los ácaros sean removidos por las abejas aseedoras. A las 24 horas se retira la hoja y se observan los detritus con una lupa, en busca del ácaro. Este método se recomienda aplicarlo a principios de primavera y fines de verano, cuando no hay, o hay poca cría y no está siendo colectado el néctar. Si existe cría es necesario desopercularla para que no constituya un refugio de ácaros. Este método puede detectar niveles de infestación bajos.

Los ácaros pueden encontrarse en las trampas para polen, por lo que es conveniente inspeccionarlas.

Fórmulas para el cálculo de los resultados.

$$\frac{\text{No. de celdas infestadas}}{\text{No. de celdas examinadas}} \times 100 = \% \text{ de infestación en panal de cría}$$

$$\frac{\text{No. de ácaros encontrados}}{\text{No. de abejas adultas examinadas}} \times 100 = \% \text{ de infestación en abejas adultas}$$

Indices de reproductibilidad y repetibilidad

Mayor al 95% si se sigue el método descrito con reactivos semejantes.

**Bibliografía**

Milne, P.S. 1948. Acarine Disease of Bees. J. Minist. Agric. Fish. 54:473-377.

**7. Enfermedad de Newcastle**

Título

Aislamiento del virus de la Enfermedad de Newcastle (ENC), por inoculación en embrión de pollo.

Objetivo

Aislar el virus de la ENC en embriones de pollo, inoculados con muestras de material biológico de aves sospechosas de estar infectadas con virus de la ENC.

Campo de aplicación

- Diagnóstico de casos clínicos.
- Obtención de la constancia de parvadas y granjas libres de la Enfermedad de Newcastle velogénico.
- Muestreo virológico en regiones, estados o zonas en proceso de erradicación, para su liberación.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Newcastle.

Manual of Standards for Diagnostic tests and Vaccines, OIE, París, Francia 1992.

Generalidades

La prueba se utiliza para el aislamiento del virus de la ENC.

Equipo e instrumentos

- 1.- Balanza granataria
- 2.- Campana de flujo laminar o mecheros
- 3.- Centrífuga clínica o refrigerada
- 4.- Microplaca fondo en "U"
- 5.- Cronómetro
- 6.- Homogeneizador, mortero y pistilo de porcelana o mortero de Tenbroeck
- 7.- Incubadora para embrión de pollo
- 8.- Micropipeta de 25 a 200 microlitros
- 9.- Ovoscopio

**Materiales**

- 1.- Algodón
- 2.- Cajas de Petri
- 3.- Cubrebocas
- 4.- Gorros
- 5.- Pinzas
- 6.- Tijeras
- 7.- Placa de vidrio para la prueba de aglutinación y/o microplaca de fondo en "U"
- 8.- Punzón para perforar embrión de pollo
- 9.- Tubos para centrífuga estériles
- 10.- Viales estériles
- 11.- Puntas para micropipeta
- 12.- Tubos de ensayo
- 13.- Filtros con membrana de nitrocelulosa con poro de 0.22 micrómetros
- 14.- Jeringas de 5, de 10 ml e insulínicas de 1 ml.

**Reactivos**

**Reactivos y soluciones.**

- 1.- Alcohol al 70%.
- 2.- Pegamento blanco, parafina o barniz para uñas (selladores).
- 3.- Solución desinfectante: Hidróxido de Sodio en solución acuosa al 2%, cloro solución acuosa al 2%, cloruro de benzalconio.
- 4.- Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) estéril pH 7.2-7.4 o caldo de fosfato de triptosa estéril.
- 5.- Suspensión de penicilina G sódica 100 000 U.I./ml y sulfato de estreptomicina 200 mg/ml.

**Biológicos:**

- 1.- Embriones de pollo, libres de patógenos específicos, de 9 a 11 días de incubación.
- 2.- Suero testigo positivo contra el virus de la ENC.
- 3.- Suspensión de glóbulos rojos de pollo al 0.5% en PBS.

**Condiciones ambientales**

Temperatura ambiente ideal de 18 a 20°C, en condiciones de esterilidad y delimitando el campo de trabajo con mecheros.

**Preparación y acondicionamiento de la muestra.**

Muestras problema: encéfalo, tráquea, pulmón, bazo y tonsilas cecales. Los órganos deben estar empacados en forma individual, en congelación con o sin PBS. Los hisopos cloacales y/o traqueales deben transportarse inmersos en PBS con penicilina estreptomicina al 1%.

**Procedimiento**

- 1.- Inoculación de embriones.

a) Pesar dos gramos de cada una de las muestras problema y colocarlas en un mortero de porcelana o en un triturador de tejidos tipo Tenbroeck para ser macerada.

Se recomienda usar morteros congelados para que la muestra se adhiera al mortero y se facilite la maceración. Para facilitar el macerar tráquea y pulmón los órganos se pueden cortar en pequeños trozos con tijeras. Se puede utilizar arena estéril como material abrasivo. Todo el proceso debe realizarse en un área estéril y las muestras deben lavarse con PBS más antibiótico antes de ser procesadas si éstas no fueron obtenidas en condiciones estériles.

b) Añadir PBS estéril más 1% de antibiótico (en una proporción 1:10, ejemplo: 1 g de órgano más 9 ml de solución).

Centrifugar a 2500 rpm durante 20 minutos como mínimo, con la finalidad de obtener el sobrenadante libre de contaminantes y estructuras celulares. Para obtener mejores resultados se recomienda filtrar.

Para la prueba se recomienda utilizar un mínimo de 5 embriones por inóculo, con 5 controles positivos y 5 negativos

c) Revisar los huevos embrionados para certificar edad, viabilidad y localizar al embrión; en el extremo opuesto al lugar donde se encuentra el embrión, se debe delimitar la cámara aérea, delineándola con lápiz para después, marcar el punto de inoculación, que debe estar localizado a una distancia aproximada de 3 mm por encima del límite de la cámara aérea.

d) Desinfectar el cascarón con alcohol al 70% e inocular con 0.2 ml de la suspensión con una jeringa insulínica (inoculación en la cámara alantoidea). Sellar con resistol blanco o parafina incubar a 37°C. Revisar con el ovoscopio a los embriones cada 24 hrs. durante 5-7 días, si durante este periodo algún embrión ha muerto se debe obtener el líquido alantoideo y realizar la prueba de hemoaglutinación en placa y/o microplaca. Embriones que mueran antes de 24 horas se considera muerte por traumatismo, contaminación bacteriana o toxicidad.

2.- Prueba de hemoaglutinación en placa.

a) Colocar en una placa de vidrio previamente desinfectada, de 0.05 a 0.1 ml de líquido alantoideo, el cual se obtiene como se indica en el punto 1.d.

b) Agregar solución de glóbulos rojos al 5% y mezclar realizando movimientos de rotación durante 1-2 min. La aglutinación de glóbulos rojos indica un resultado positivo a la prueba. Para constatar que la hemoaglutinación fue debida al virus de la ENC es necesario realizar la prueba de inhibición de la hemoaglutinación con suero testigo positivo contra la Enfermedad de Newcastle.

c) Colocar la misma cantidad (de 0.05 a 0.1 ml) de líquido alantoideo y suero testigo positivo contra la Enfermedad de Newcastle, mezclar realizando movimientos de rotación durante 1-2 minutos, posteriormente añadir glóbulos rojos al 5% y mezclar nuevamente. Si el líquido alantoideo es positivo al virus de la ENC, se inhibirá la hemoaglutinación con el suero testigo positivo contra la Enfermedad de Newcastle. En el caso de que sea negativo, la hemoaglutinación se presentará. En este último caso, es necesario realizar dicha técnica con suero testigo positivo contra la Influenza aviar H5N2.

Es importante señalar que la actividad hemoaglutinante y la inhibición de la hemoaglutinación se pueden realizar en microplaca, ya que el método es más sensible. La hemoaglutinación que se observa en la prueba de placa después de 8 minutos puede deberse a contaminación bacteriana.

Fórmulas de cálculo para resultados

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados

Si la prueba de hemoaglutinación es positiva, debe repetirse el procedimiento con suero hiperinmune y si se sigue observando hemoaglutinación, la muestra problema se considera negativa a la ENC. Si no existe hemoaglutinación la muestra es positiva. Cuando desde la primera vez no hay hemoaglutinación, la prueba y por lo tanto la muestra son consideradas negativas a la ENC.

Si el fluido es positivo a ENC, el tipo de cepa aislada se podrá identificar con base al tiempo que tardó en matar al embrión, utilizando la clasificación americana.

| Cepa        | Clasificación americana (horas) | Clasificación europea (horas) |
|-------------|---------------------------------|-------------------------------|
| velogénica  | 24-48                           | 40-60                         |
| mesogénica  | 48-72                           | 60-90                         |
| lentogénica | > 72                            | > 90                          |

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor a un 90% si se sigue el método descrito con reactivos y biológicos semejantes.

Bibliografía

Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, OIE. París, Francia 1992.

A laboratory Manual for the Isolation and Identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathologists. Third Edition. USA. 1989.

**8. Influenza aviar**

Título

Aislamiento del virus de Influenza aviar (IA) por inoculación en embrión de pollo.

Objetivo

Aislamiento del virus de Influenza aviar y su identificación para efectuar un diagnóstico concluyente.

Campo de aplicación

El procedimiento se empleará en el aislamiento del virus de Influenza aviar en aves enfermas o muertas de parvadas con signos clínicos y lesiones a la necropsia que sugieran la presencia de Influenza Aviar.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.

Generalidades

La inoculación en embriones de pollo de 9 a 11 días de incubación, se utiliza en el aislamiento e identificación del virus de Influenza Aviar, debido a la susceptibilidad que estos embriones presentan para la replicación del virus.

Equipo e instrumentos

- 1.- Balanza granataria
- 2.- Campana de flujo laminar o mecheros
- 3.- Centrífuga clínica o refrigerada
- 4.- Cronómetro
- 5.- Homogeneizador, morteros y pistilo de porcelana o mortero de Tembroeck
- 6.- Incubadora para embrión de pollo
- 7.- Microscopio óptico, microscopio invertido o estereoscópico
- 8.- Micropipeta de 25 a 200µl
- 9.- Microplacas de 96 pozos fondo en "U"
- 10.- Ovoscopio.

Materiales

- 1.- Cajas de Petri
- 2.- Cubrebocas
- 3.- Filtros con membrana de nitrocelulosa poro de 0.22 µm. (opcional).
- 4.- Gorros
- 5.- Jeringas insulínica, de 5 y 10 ml
- 6.- Micropipeta de 25 a 200 µl.
- 7.- Pinzas
- 8.- Puntas para micropipeta
- 9.- Punzón para perforar embrión de pollo
- 10.- Tijeras
- 11.- Tubos de centrífuga
- 12.- Tubos de ensayo
- 13.- Viales estériles.

Reactivos

Reactivos y soluciones:

- 1.- Alcohol 70%
- 2.- Anticoagulante de Alseaver
- 3.- Caldo infusión de cerebro y corazón.
- 4.- Pegamento blanco, parafina o barniz para uñas (selladores).
- 5.- Solución desinfectante: Hidróxido de Sodio en solución acuosa al 2%, cloro solución acuosa al 2%, cloruro de benzalconio
6. Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) estéril pH 7.2-7.4 o caldo de fosfato de triptosa estéril.
7. Suspensión de penicilina G sódica 100,000 U.I./ml y sulfato de estreptomycinina 200 mg/ml.

Biológicos.

- 1.- Suspensión de glóbulos rojos de pollo al 0.5%.
- 2.- Embriones de pollo libres de patógenos específicos de 9 a 11 días de incubación.
- 3.- Suero positivo contra el virus de Influenza aviar H5N2.
- 4.- Suero positivo contra el virus de la Enfermedad de Newcastle.

Condiciones ambientales

Temperatura ambiente ideal de 18 a 20°C, en condiciones de esterilidad y delimitando el campo de trabajo con mecheros. Con medidas de bioseguridad eficientes.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Muestras problema: tráquea, pulmón, bazo y riñón. Los órganos deben estar empacados en forma individual, en congelación con o sin PBS. Los hisopos cloacales y/o traqueales deben transportarse inmersos en PBS con penicilina estreptomycinina al 1%.

#### 1.- Preparación del inóculo:

- a) Pesar los órganos y hacer una suspensión al 20% en el caldo infusión de corazón y cerebro o PBS.
- b) Triturar en el homogeneizador o con un mortero. El homogeneizado se transfiere a un tubo de centrífuga.

Centrifugar durante 15 minutos a 5,000 r.p.m.

c) Colectar el sobrenadante y agregar antibióticos: 5,000 a 10,000 U.I. de penicilina y 10 a 100 mg de estreptomycin por mililitro de inóculo o filtrar con membranas de nitrocelulosa.

d) Dejar actuar a los antibióticos durante 30 minutos, conservando la muestra en refrigeración.

#### 2.- Inoculación de embriones de pollo:

a) Revisar los embriones de pollo para certificar la edad, viabilidad y localizar el embrión; en el extremo opuesto al lugar donde se encuentra el embrión se debe delimitar la cámara de aire y marcar el punto de inoculación, éste debe estar localizado del lado opuesto al embrión y a una distancia aproximada de 3 mm por encima del límite de la cámara de aire.

b) Desinfectar el cascarón con alcohol al 70% y perforarlo en el punto marcado.

c) Inocular cuando menos 5 embriones por cada inóculo, aplicando 0.2 ml vía cavidad alantoidea.

d) Sellar los embriones e incubar a 37°C durante 5 a 7 días. Revisar con el ovoscopio cada 24 horas.

Los embriones que mueran durante a las 24 horas postinoculación deben descartarse. Esta mortalidad puede deberse a contaminación bacteriana, toxicidad o traumatismo.

La embriones muertos a las 48 horas se refrigeran y posteriormente se colecta el líquido amnioalantoideo.

#### 3. Identificación del virus de la I.A.:

a) En una caja de Petri se colocan 3 gotas de líquido alantoideo colectado en diferentes áreas y separadas suficientemente una de otra. A una de las gotas se le agrega un volumen igual de suero testigo positivo contra el virus de Influenza Aviar; en la siguiente, suero testigo positivo contra el virus de la Enfermedad de Newcastle y en la tercera solamente solución salina. Se permite efectuar la reacción antígeno-anticuerpo durante 5 minutos.

b) Se agrega una gota de la suspensión de eritrocitos de pollo a cada una de las mezclas y se agita manualmente en forma circular durante 1 minuto.

##### Fórmulas de cálculo

En esta técnica no se utilizan.

##### Interpretación de resultados

Observar al microscopio. Después de 5 minutos los eritrocitos en la mezcla de solución salina y líquido amnioalantoideo debe presentar aglutinación de eritrocitos. Esto indica la presencia de un virus hemoaglutinante.

En la mezcla del suero testigo positivo contra Influenza Aviar y el líquido alantoideo conteniendo el virus hemoaglutinante, no debe existir aglutinación de eritrocitos, esto significa que los anticuerpos bloquean la actividad hemoaglutinante del virus de Influenza Aviar, confirmando la presencia de éste.

Con el suero testigo positivo contra la Enfermedad de Newcastle la actividad hemoaglutinante del virus no debe inhibirse.

Si el resultado es negativo deben de efectuarse pruebas de precipitación en agar para determinar la presencia de las proteínas de la envoltura viral comunes para todos los virus de Influenza Aviar.

Si la prueba de inmunodifusión en gel es positiva deberá determinarse el subtipo de hemoaglutinina y neuraminidasa presentes en el virus aislado utilizando los sueros específicos de referencia.

##### Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor a un 90% si se sigue el método descrito con reactivos y biológicos semejantes.

##### Bibliografía o referencia:

Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, OIE. París, Francia 1992.

A laboratory Manual for the Isolation and Identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathologists. Third Edition. USA. 1989. 2.- Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, OIE. París, Francia 1992.

Manual de Técnicas de Diagnóstico para Influenza Aviar. Laboratorio de diagnóstico de la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales. México, 1995.

Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition for Influenza Aviar. Aviar Section NVSL.

##### Título

Prueba de inmunodifusión en gel de agar (IGA) para diagnóstico de Influenza Aviar (IA).

##### Objetivo

Determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de la Influenza aviar.

Identificar el antígeno lipoproteico de la envoltura del virus de la Influenza aviar.

Campo de aplicación

Determinar la presencia de anticuerpos contra antígenos de grupo del virus de la Influenza Aviar, en aves vacunadas o que han sufrido esta enfermedad.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-044-Z00-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.

Generalidades

La IGA es la migración concurrente de un antígeno y un anticuerpo a través de una matriz de gel de agar. Cuando el antígeno y los anticuerpos se ponen en contacto se combinan, formando líneas de precipitación visibles.

Equipo e instrumentos

- 1.- Lámpara de observación en fondo oscuro.
- 2.- Micropipeta de 100 microlitros.
- 3.- Sacabocados de 5 mm.

Material

- 1.- Cajas de Petri, 100 x 15 mm.
- 2.- Puntas para micropipeta.

Reactivos

Reactivos y soluciones:

- 1.- Agarosa grado reactivo para electroforesis o agar noble.
- 2.- Cloruro de sodio. NaCl
- 3.- Fosfato de sodio dibásico anhidro.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- 4.- Fosfato de sodio monobásico anhidro.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Biológicos:

- 1.- Antígeno soluble del virus de Influenza Aviar para IGA.
- 2.- Suero testigo positivo contra el virus de Influenza Aviar (factor para reforzar las líneas de precipitación).

Condiciones ambientales

De laboratorio, con medidas de bioseguridad.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Muestras de sueros sospechosos.

Procedimiento

a) Preparar agarosa al 1% en solución salina fosfatada 0.15 M con un pH 7.2, adicionando 8.5% de cloruro de sodio.

b) Fundir la agarosa mediante ebullición o en autoclave durante 10 minutos a 120°C.

c) Distribuir 20 ml de agarosa fundida en cajas de Petri de 100 x 15 mm. Dejar que el agar solidifique destapando parcialmente las cajas de Petri durante 1 hora. Tapar y conservar en refrigeración.

d) Utilizando la plantilla sacabocados, cortar el número de grupos de pozos necesarios para los sueros que se han de procesar.

e) Con una cánula y un aspirador quitar el agar que se ha separado al cortar los pozos.

f) Con la cánula hacer una marca próxima al pozo que se denominará pozo número 1, los demás pozos se enumeran en el sentido de las manecillas del reloj.

g) Identificar y hacer una relación exacta de los sueros que se someten a la prueba.

h) Llenar el pozo central con el antígeno y los pozos periféricos con los sueros, colocándolos en el siguiente orden:

i) Con la micropipeta de 100µl, se colocan en los pozos 1, 3 y 5, 25µl de suero positivo (control) en cada uno, y en los pozos 2, 4 y 6, 25µl de suero problema. Se emplea una punta para micropipeta por cada suero.

j) Una vez colocados los sueros, la caja de Petri se tapa y se deja a temperatura ambiente durante 24 horas, después de las cuales se efectuará la lectura.

Fórmulas de cálculo

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de los resultados

El suero positivo (de refuerzo) siempre formará una línea de precipitación equidistante respecto al pozo central (antígeno). Si la reacción de los sueros problema es positiva, se forman líneas de precipitación que se unirán con las del suero control positivo dando lugar a líneas de identidad total.

Los resultados obtenidos son cualitativos.

Índices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor a un 90% si se sigue el método descrito con reactivos y biológicos semejantes.

**Bibliografía**

Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, OIE. París, Francia 1992.

A laboratory Manual for the Isolation and Identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathologists. Third Edition. USA. 1989. 2.- Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, OIE. París, Francia 1992.

Manual de Técnicas de Diagnóstico para Influenza Aviar. Laboratorio de diagnóstico de la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales. México, 1995.

**Título**

Inhibición de la hemoaglutinación (IH) para el diagnóstico de la Influenza aviar (IA).

**Objetivo**

Determinar la presencia y cuantificar anticuerpos específicos contra el virus de la Influenza Aviar presentes en el suero, sangre absorbida en papel filtro o yema de huevo de aves vacunadas o que han sufrido una infección con este virus.

**Campo de aplicación**

Operativo de control y erradicación de la Influenza aviar en México.

**Documentos conexos a consultarse**

Norma Oficial Mexicana NOM-044-Z00-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.

**Generalidades**

La IH es la interacción de anticuerpos específicos con la hemoaglutinina homóloga del virus de la IA, evitando la aglutinación de los eritrocitos de pollo.

**Equipo e instrumentos**

- 1.- Agitador para microplacas
- 2.- Centrífuga clínica
- 3.- Espectrofotómetro
- 4.- Incubadora para embrión de pollo
- 5.- Lector para microplacas
- 6.- Microaglutinoscopio
- 7.- Micropipeta multicanal con volumen ajustable de 100 a 200 µl.
- 8.- Micropipeta multicanal con volumen ajustable de 25 a 50 µl.
- 9.- Ovoscopio
- 10.- Potenciómetro o tiras de papel indicador de pH
- 11.- Punzón para perforar el embrión de pollo
- 12.- Refrigerador doméstico.

**Materiales**

- 1.- Contenedores de plástico para reactivos
- 2.- Frascos de plástico o vidrio con tapón de baquelita
- 3.- Jeringas de 5 y 10 ml.
- 4.- Microplacas con fondo en "U" o con fondo en "V"
- 5.- Microplacas con fondo plano
- 6.- Puntas para micropipetas
- 7.- Tubos de ensayo.

**Reactivos****Reactivos y soluciones:**

Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), pH de 7.2 a 7.4, preparada de la siguiente forma:

Solución A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro 0.15 M (21.3 g) + NaCl 8.5 g + 1 l de agua destilada.

Solución B: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro 0.15 M (19.0 g) + NaCl 8.5 g + 1 l de agua destilada.

Solución de trabajo: Solución A (80 ml) + solución B (20 ml) con lo cual queda ajustada a un pH de 7.2 a 7.4.

2.- Diluyente para el antígeno: Se emplea la solución de trabajo adicionada con 0.02% de albúmina sérica bovina.

3.- Anticoagulante de Alseaver para la muestra de sangre de pollo de donde se obtendrán los eritrocitos utilizados en la prueba.

Dextrosa 20.5 g + citrato de sodio 0.8 g + ácido cítrico 0.55 g + cloruro de sodio 4.2 g + 1 l de agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 100°C durante 15 minutos.

**Biológicos:**

- 1.- Huevos embrionados de pollo de 9 a 11 días de incubación.

2.- Eritrocitos de pollo lavados a una concentración final de 0.5% en PBS, los cuales se procesan de la siguiente manera:

- a) Se colecta una muestra de sangre de un pollo sano con el anticoagulante de Alseaver (v/v).
- b) Se lavan los eritrocitos en un tubo para centrífuga colocando un volumen de sangre con Alseaver y llenando el tubo con PBS.
- c) Invertir el tubo varias veces para suspender perfectamente los eritrocitos.
- d) Centrifugar la sangre de 500 a 800 rpm, durante 10 minutos.
- e) Eliminar el sobrenadante y la capa de leucocitos (capa blanca).
- f) Llenar nuevamente el tubo con la PBS.
- g) Repetir el ciclo de lavado y centrifugación 2 veces más. Posteriormente, diluir los eritrocitos a una concentración final de 0.5% en PBS sin albúmina.

3.- Suero testigo positivo contra el serotipo de virus que se utiliza en la prueba.

4.- Antígeno viral (H5N2) inactivado.

Titulación del antígeno:

- a) Inocular huevos embrionados de pollo de 9 a 11 días de incubación con 0.1 ml de una dilución 10<sup>-3</sup> de la cepa viral, vía cavidad alantoidea.
- b) Incubar los huevos inoculados a 35-36°C por 3 días. Revisarlos diariamente; descartar los muertos dentro de las primeras 24 horas. Refrigerar los huevos con embriones aún vivos a 4°C durante toda la noche y cosechar el fluido alantoideo (FA) de todos los huevos (con embriones vivos o muertos).
- c) Inactivar el virus con beta-propiolactona (BPL) a una concentración final de 0.01% por 2 horas a temperatura ambiente, después dejar toda la noche a 4°C. La suspensión de virus debe ser agitada o mezclada constantemente durante todo el proceso de inactivación. La BPL es un carcinógeno y debe ser manejada cuidadosamente.
- d) Después de la inactivación, ajustar el pH del FA de 7.0 a 7.2 usando bicarbonato de sodio al 10% (Usualmente se requieren de 1-2 ml /100 ml de FA).
- e) Comprobar la ausencia de virus viable en el FA inoculando huevos embrionados de pollo, con una dilución (generalmente 1:10) de la preparación viral inactivada.
- f) Centrifugar el antígeno a 1500 rpm, por 30 minutos para eliminar los precipitados que puedan haberse formado durante el proceso de inactivación.

Condiciones ambientales.

De laboratorio a temperatura óptima entre 18-20 °C con medidas de bioseguridad.

Preparación y acondicionamiento de la muestra.

1.- Titulación del antígeno por la prueba de hemoaglutinación (HA).

El principio de la HA se basa en la capacidad de la hemoaglutinina, una de las dos glicoproteínas presentes en la superficie de los ortomixovirus, de unirse a receptores que se encuentran en la membrana de los eritrocitos.

La HA se produce cuando la proporción de la hemoaglutinina viral y la de eritrocitos es óptima, permitiendo la unión de varios eritrocitos adyacentes a una unidad de hemoaglutinina. Esto tiene por objeto detectar y cuantificar la presencia de virus hemoaglutinantes aislados y propagados en huevos embrionados o en cultivos celulares.

Titulación del antígeno por HA:

- a) Colocar 50 microlitros de diluyente para el virus en cada uno de los 12 pozos de dos filas de una microplaca con fondo en "U".
- b) Agregar 50 microlitros en el primer pozo de cada fila.
- c) Utilizando micropipeta de 50 microlitros, se efectúan diluciones Log<sub>2</sub> seriadas (de 1:2 a 1:1024) del antígeno dejando los 2 últimos pozos de cada fila sin antígeno para que sirvan como control de eritrocitos.
- d) Agregar 50 µl de la suspensión de eritrocitos al 0.5% a cada pozo y agitar la microplaca para mezclar los reactivos.
- e) Cubrir la microplaca e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Realizar la lectura hasta que se forme un botón bien delimitado en el fondo de los pozos control de eritrocitos.

Interpretación de la titulación del antígeno:

El punto final de la titulación será en la dilución más alta del antígeno en la que se observe el 100% de hemoaglutinación. Se considera que en esta dilución existe una unidad hemoaglutinante (UHA).

La dilución conteniendo las UHA deseadas del antígeno se determina dividiendo el punto final de la HA entre el número de unidades.

2.- Muestras de suero.

- a) Identificar con exactitud las muestras problema que se someterán a la prueba.

b) Diluir los sueros en una microplaca con fondo plano identificada como "placa de la dilución inicial" (dilución 1:5), depositando en todos los pozos 100 microlitros de PBS y, posteriormente, depositar 25 microlitros de cada suero en el pozo respectivo, siguiendo el orden secuencial de las muestras. Ejemplo: En el pozo A1 colocar el suero número 1; en el pozo A12 el suero número 12; en el pozo B1 el suero número 13 y así sucesivamente hasta el pozo H12 en el cual se colocará el suero número 96.

3.- Muestras de sangre en papel filtro.

a) Hacer una relación exacta de las muestras que se someterán a prueba.

b) Reconstituir las muestras en una microplaca con fondo plano identificada como "placa de la dilución inicial" (dilución 1:5). En el extremo de la tira de papel filtro en el que se encuentra la muestra, cortar un trozo de 2 mm de largo y colocarlo en uno de los pozos de la microplaca (puesto que el papel mide 50 x 5 mm, 2 mm de largo tendrán una superficie de 10 mm<sup>2</sup> que absorberán los 25 microlitros de la muestra que se requieren para la dilución indicada previamente).

c) Depositar 100 microlitros de PBS en cada pozo que contenga una muestra.

d) Agitar durante 1 hora como mínimo.

4.- Muestras de yema de huevo.

a) Identificar perfectamente y ordenar los grupos de huevo que se someterán a la prueba colocándolos con la cámara de aire hacia arriba.

b) Con un punzón, perforar el polo superior del cascarón.

c) Obtener 0.5 ml de la yema, utilizando una jeringa de 5 ml con aguja calibre 14 x 37 mm introduciendo la aguja aproximadamente 3 cm a través de la perforación hasta llegar a ésta.

d) Vertir una gota de la yema en un pozo de una microplaca con fondo plano identificada como "placa de la dilución inicial" para realizar la dilución de inicio (1:5), utilizando un pozo por cada muestra (una gota de la yema equivale a un volumen de 50 microlitros).

e) Agregar 200 microlitros de PBS en cada uno de los pozos que contienen una muestra y agitar durante 30 minutos.

Estas microplacas con la dilución inicial podrán sellarse y conservarse en congelación para efectuar pruebas posteriores.

Procedimiento

Prueba de la IH (prueba tamiz)

a) Con una micropipeta de 12 canales, transferir 25 microlitros de las muestras de cualquiera de los casos antes mencionados, a la línea de pozos A1 al A12 de la microplaca de la dilución inicial (dilución 1:5) a la primera línea de pozos de una microplaca con fondo en "U" en la que se efectuará la prueba y en la que previamente se hayan colocado 25 microlitros de PBS para la realización de dos diluciones dobles seriadas.

b) Mezclar las muestras y transferir 25 microlitros de los pozos de la línea A a la B, se mezclan nuevamente y se descartan 25 microlitros. En la línea A la dilución quedará 1:10 y en la línea B será 1:20.

c) Esta operación se repite con los demás sueros empleando 2 pozos por cada suero. En cada microplaca de prueba se debe tener un suero positivo y eritrocitos sólo con PBS como testigos.

d) Una vez efectuadas las diluciones agregar 25 microlitros del antígeno de Influenza Aviar, diluido en el "Diluyente para el antígeno", conteniendo 4 UHA/25 microlitros. Cubrir, agitar e incubar la microplaca a temperatura ambiente durante 30 minutos.

La dilución conteniendo las 4 UHA del antígeno que se requieren para la prueba se determina dividiendo el punto final de la HA entre el número de unidades deseadas. Ejemplo: Título del antígeno=256 UHA, unidades deseadas= 4 (256/4=64), haciendo una dilución 1:64 se obtendrán 4 UHA en 25 microlitros. Después de agregar la dilución del antígeno se deberá comprobar el número de UHA utilizadas en la prueba.

e) Agregar 50 microlitros de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5 % a cada pozo, cubrir y agitar la microplaca e incubar a temperatura ambiente hasta que los eritrocitos testigo sedimenten hasta formar un botón bien delimitado (30-45 minutos).

f) Algunos sueros contienen aglutininas naturales que aglutinan en forma inespecífica a los eritrocitos y si no se eliminan pueden obtenerse resultados erróneos (falsos negativos). Estas reacciones inespecíficas en las diluciones iniciales pueden evitarse diluyendo los sueros 1:10 y empleando ésta como dilución inicial.

Fórmulas de cálculo para resultados

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados

Prueba de la IH.

Esta prueba se lee cuando los eritrocitos testigo sedimenten, formando un botón circular, con bordes bien delimitados, en el fondo del pozo.

La inhibición de la hemoaglutinación producida por los sueros positivos tiene un patrón semejante al de los eritrocitos testigo, un botón circular con bordes definidos que se desliza tomando la forma de una gota en el fondo del pozo, al inclinar la microplaca en un ángulo de 45°.

Cuando los sueros son negativos y no alcanzan a inhibir la acción hemoaglutinante del antígeno, los eritrocitos se sedimentan formando una capa uniforme en el fondo de los pozos.

Deberá efectuarse la titulación para determinar el punto final de las muestras que resulten positivas en esta prueba tamiz, realizando un número mayor de diluciones Log2 seriadas. Todos los sueros que produzcan inhibición de la hemoaglutinación en la dilución 1:10 deben considerarse positivos.

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor al 95% si se sigue estrictamente el método descrito, con reactivos y biológicos semejantes.

Bibliografía

Haemagglutination and Haemagglutination - Inhibition for Avian Influenza. Avian Section, National Veterinary Service Laboratory, USDA.

Haemagglutination and Haemagglutination - Inhibition Test Official. Journal of the European Communities, No. 1 167/11.

Manual de Técnicas de Diagnóstico para Influenza Aviar. Laboratorio de diagnóstico de la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales. México, 1995.

Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, OIE. París, Francia 1992.

Métodos para Expresar las Tasas de Anticuerpos. Thrusfield, M. Epidemiología Veterinaria. Ed. Acribia. España, 1990.

## 9. Salmonelosis aviar

Título

Aislamiento e identificación de *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*.

Objetivo

Aislamiento e identificación de *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum* a partir de especímenes aviares.

Campo de aplicación

Para la obtención de la constancia de parvadas, granjas, empresas, aves libres y en control; así como para el muestreo en regiones o zonas de erradicación tendientes a su liberación.

Documentos conexos a consultarse.

Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar.

Generalidades

La salmonelosis de las aves causada por *Salmonella pullorum* o *Salmonella gallinarum* es una enfermedad que afecta a las gallinas, pavos, pollos, patos, faisanes, guajolotes, aves de combate, aves de ornato, aves canoras y aves silvestres comerciales en producción o crianza. La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural mantiene un programa de campaña para su control, erradicación y liberación.

Equipo e instrumentos

- 1.- Balanza granataria
- 2.- Congelador
- 3.- Digestor
- 4.- Estufa bacteriológica
- 5.- Mecheros
- 6.- Microscopio óptico
- 7.- Refrigerador.

Materiales

- 1.- Asas bacteriológicas
- 2.- Cajas de Petri de 15 x 100
- 3.- Charolas
- 4.- Espátulas
- 5.- Frascos de cristal medianos esterilizables (tipo Gerber)
- 6.- Morteros de porcelana
- 7.- Pinzas
- 8.- Portaobjetos

- 9.- Tijeras
- 10.- Tubos de vidrio c/tapón de rosca
- 11.- Bolsas de plástico, estériles, para el digestor.

Reactivos

Medios de cultivo requeridos para el aislamiento de *S. pullorum* y *S. gallinarum*.

- a) Caldos de enriquecimiento selectivos y no selectivos:

- Caldo tetracionato con verde brillante
- Caldo tetracionato
- Caldo selenito

- b) Medios de cultivo:

- Agar MacConkey
- Agar verde brillante
- Agar XLT-4

- c) Medios para bioquímica:

- Citrato de Simmons
- LIA
- MIO
- SIM
- TSI
- Urea
- Fenilalanina

- d) Medios para bioquímica complementarios:

- Caldo malonato
- Dulcitol
- Glucosa con tubo Durham
- Lactosa
- Maltosa
- Tartrato de Jordán

Biológicos:

- e) Antisueros requeridos para serotipificación:

- Antisuero polivalente Ai and Vi.
- Antisuero somático ("O") grupo D1 Fact 1, 9, 12

Condiciones ambientales

De laboratorio.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Las muestras de hígado, bazo, vesícula biliar, ovarios, testículos, tonsilas cecales, páncreas, médula ósea, saco vitelino y embriones no requieren de un tratamiento específico antes de su análisis, sólo su conservación en refrigeración en frascos o bolsas estériles de polietileno no más de 24 horas.

Los hisopos cloacales y/o hisopos con heces frescas se deben enviar en recipientes estériles, herméticamente cerrados, deben contener agua peptonada o cualquier otro medio de transporte adecuado para el género *Salmonella* y deben conservarse en refrigeración no más de 48 horas y éstas deben venir acompañadas de su historia clínica completa, con las fechas de toma de muestra y envío al laboratorio.

Las harinas de origen aviar deben ser remitidas en bolsas de polietileno o frascos estériles.

El huevo debe remitirse en contenedores que protejan al huevo y en refrigeración.

Procedimiento

Método para el aislamiento de *S. pullorum* y *S. gallinarum*:

Colocar la muestra en caldo de enriquecimiento en una proporción de 1:10 muestra caldo y/o inocular en medios sólidos.

Incubar durante 24 horas a 37°C. En caso de ser negativo el crecimiento a *Salmonella sp*; resembrar a las 48 y 72 horas, antes de desechar el medio líquido de enriquecimiento.

Inocular colonias sospechosas a medios para identificación bioquímica. Incubar durante 24 hrs. a 37°C.

Proceder a la serotipificación.

Fórmulas de cálculo para resultados

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados

Se considera negativo el resultado cuando después de sembrar a las 24, 48 y 72 horas no hay crecimiento o colonias sospechosas de *Salmonella*.

Índices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor al 95% se sigue estrictamente el método descrito.

Bibliografía

Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

A Laboratory Manual for the Isolation and identification of avian pathogens. Third ed. 1989. The American Association of avian pathologists.

Título

Aglutinación rápida en placa con suero o sangre completa (APSP) para diagnóstico de salmonelosis aviar.

Objetivo

Detección de anticuerpos en aves portadoras de *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*.

Campo de aplicación

Para la obtención de la constancia de parvadas progenitoras y reproductoras libres de salmonelosis aviar.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar.

Generalidades

Esta prueba puede ser aplicada como prueba de campo o en el laboratorio aprobado por la Secretaría como complementaria a la bacteriológica.

Equipo e instrumentos:

- 1.- Aglutinoscopio metálico o de madera con fuente de luz para facilitar la lectura
- 2.- Cronómetro

Materiales.

- 1.- Aguja para sangrado
- 2.- Algodón o toallas desechables
- 3.- Asa bacteriológica de 0.03 ml, tubo capilar de vidrio, gotero, pipeta graduada o pipeta Pasteur.
- 4.- Palillos de madera.
- 5.- Placa de vidrio para la prueba de aglutinación o portaobjetos.

Reactivos

Biológicos:

Antígeno K polivalente de *Salmonella pullorum* compuesto por cepas estándar y variantes.

- Sueros testigos positivos y negativos.

Condiciones ambientales

La temperatura óptima para llevar a cabo la prueba es de 20 a 22 grados centígrados, si ésta es mayor ocurrirá una más rápida evaporación o dará aglutinación de tipo inespecífica; por el contrario, si es menor la reacción será más lenta.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Deben tomarse las precauciones necesarias, para mantener cautivas las aves que se van a muestrear.

Para el caso de muestras de suero, éste debe ser conservado en condiciones de refrigeración, con la previa separación del coágulo, las muestras no deben estar hemolizadas.

Procedimiento

- Puncionar la vena braquial.
- Colectar una gota de sangre con un asa bacteriológica o tubo capilar.
- Colocar la gota en una placa de vidrio.
- Adicionar una gota de 0.03 ml del antígeno K polivalente.
- Mezclar la sangre con el antígeno teñido y agitar la placa con un palillo de madera, utilizando un palillo para cada muestra, mover la placa con 3 o 4 movimientos rotatorios en forma manual.

Fórmulas de cálculo para resultados

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados

El resultado de la prueba se considera positivo si la aglutinación ocurre entre cero y noventa segundos después de mezclar la muestra de sangre o del suero con el antígeno.

El resultado de la prueba se considera sospechoso si la aglutinación ocurre entre noventa y ciento veinte segundos después de mezclar la muestra de sangre o suero con el antígeno.

El resultado de la prueba se considera negativo si la aglutinación ocurre después de 120 segundos posteriores a la mezcla de la muestra de sangre o suero con el antígeno.

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor al 95% se sigue estrictamente el método descrito.

Bibliografía

Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar.

Culture Methods for the Detection of Animal Salmonellosis and Arizonosis. A manual of the American Association of Veterinary Laboratory. Diagnosticians. Iowa States University Press/Ames 1976.

#### **10. Diagnóstico taxonómico de garrapatas**

Título

Diagnóstico taxonómico de garrapatas.

Objetivo

Identificación taxonómica de las garrapatas de mayor importancia en México.

Campo de aplicación

La metodología aquí descrita es para aplicarse en los laboratorios de pruebas que realizan el diagnóstico de las infestaciones por garrapata de uno y tres huéspedes comunes en el ganado bovino.

En el presente apartado se describen brevemente las características morfológicas de algunos géneros de garrapatas para su identificación. Aunque las claves aquí señaladas no permiten determinar todas las especies que se conocen en nuestro país, brindan orientación en cuanto a los tipos de garrapatas predominantes en la infestación de los animales.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus* spp.

Equipo e instrumentos.

1.- Microscopio estereoscópico

2.- Lámpara de restirador

Materiales

1.- Cajas de Petri desechables o de cristal

2.- Plastilina

3.- Aguja de disección

4.- Pinzas de relojero o de disección

Reactivos:

1.- Alcohol 70%

Condiciones ambientales

No se requieren en especial.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

No hay requerimientos.

Procedimiento

Para efectos de una adecuada clasificación se explican inicialmente los términos utilizados para la taxonomía.

**Ambulacro.-** también conocido como pulvilo, es un órgano adhesivo que se encuentra en el extremo distal del tarso y sirve de base a las garras. Se encuentra más desarrollado en la familia Ixodidae que en la Argasidae.

**Camerostoma.-** es un repliegue del idiosoma que sirve para alojar el gnatosoma.

**Capuchón.-** es un borde del camerostoma que puede cubrir total o parcialmente el gnatosoma, encontrándose muy desarrollado en el género *Ornithodoros* spp, perteneciente a la familia Argasidae.

**Coxa.-** pequeñas placas muy esclerotizadas de posición ventral, que representan el primer artejo de las patas. A cada coxa se le une un trocánter móvil. Se designan con números romanos de la parte anterior a la posterior del idiosoma.

**Cuernos.-** proyecciones quitinosas del borde posterior de la base del gnatosoma en sus porciones laterales.

**Dientes.-** proyecciones pequeñas y curvas, sobre la zona ventral del hipostoma.

**Escudo.-** placa dorsal muy esclerotizada, de posición posterior al gnatosoma en las garrapatas duras. Cubre casi por completo la superficie dorsal del idiosoma del macho, y aproximadamente la mitad de esta superficie en la hembra poco repleta.

**Escotadura.-** hendiduras o concavidades presentes en las coxas, porciones de los miembros y placas adanales.

**Espolones.-** proyecciones redondeadas y puntiagudas, pequeñas o grandes de la superficie o del margen posterior de las coxas. Las proyecciones situadas sobre la cara media se llaman espolones internos y las de la cara lateral se denominan espolones externos. Estas estructuras también se presentan en el extremo distal de los tarsos.

**Espina.-** sinónimo de espolón.

**Espina caudal.-** proyección quitinosa del borde posterior del idiosoma.

**Festones.-** áreas rectangulares uniformes, separadas por surcos bien patentes, que se localizan en el borde posterior del idiosoma de muchos géneros de garrapatas duras, tanto en machos como en hembras, pudiendo presentarse leves o muy marcados según estado de repleción y según el género varían en número de 7 a 11.

**Genital, orificio.-** abertura externa de los órganos sexuales, presentes sólo en el estadio adulto hembras o machos, ausente en el estadio ninfal y larval. En los machos de la familia Ixodidae tiene forma de ranura, y en las hembras de la misma familia su forma generalmente es de "U". En especímenes poco repletos se encuentra situado a la altura del 2o. par de coxas sobre la línea media. En los machos de la familia Argasidae es en forma de una semi-luna, y en las hembras es en forma de ranura, se encuentra situado a la altura del primer par de coxas.

**Globuloso.-** también conocidos como Anillos o Esferas, son estructuras circulares localizadas en las placas estigmatales y varían en tamaño y número según género y especie.

**Gnatosoma.-** porción anterior y móvil del idiosoma de las garrapatas duras (Ixodidae), que incluye la base del gnatosoma, pedipalpos, hipostoma y queliceros. Localizado ventralmente en las garrapatas blandas (Argasidae)

**Hipostoma.-** estructura que forma parte del gnatosoma, localizado ventralmente y en el que se asientan los dientes, su forma puede ser en forma de mazo o de punta de flecha.

**Línea de Sutura.-** línea bien perceptible del cuerpo de las garrapatas del género *Argas*, que marca la separación entre la superficie dorsal y ventral.

**Mamelón.-** protuberancia quitinosa de forma esferoide presente en el borde interno de los festones.

**Orificio anal.-** abertura por la cual se desechan los productos finales de la digestión. Está situado ventralmente sobre la línea media y posterior al último par de patas.

**Ornamentos.-** dibujos o estructuras que se localizan sobre la superficie del escudo o del tegumento.

**Patatas.-** órganos de locomoción, formados por seis artejos: coxa, trocánter, fémur, tibia, pretarso y tarso, este último lleva las usa y otras estructuras como el ambulacro.

**Placa estigmatal.-** órganos respiratorios en número par, localizados a los lados en la superficie del cuerpo de las garrapatas y atrás del último par de coxas en los ixodidos y entre el 3er. y 4o. par de coxas en los argásidos. Están presentes en los estados ninfal y adulto, su forma puede ser oval, redonda o en forma de coma.

**Placas accesorias.-** estructuras quitinosas, alargadas, situadas en la porción posterior y ventral del idiosoma al lado externo de las placas adanales.

**Placas adanales.-** de la misma naturaleza y forma de las anteriores, se encuentran situadas en porción posterior y ventral del idiosoma a los lados del orificio anal.

**Pedipalpos.-** son estructuras que forman parte del gnatosoma, están en números par y articulados, se localizan a los lados del hipostoma y los queliceros.

**Porosas, áreas.-** depresiones pares que se localizan en la base del gnatosoma de las hembras de la familia ixodidae únicamente.

**Protuberancia.-** cualquier elevación o prominencia en una superficie.

**Queliceros.-** estructuras pares de situación dorsal al hipostoma, sirven para cortar la piel del huésped y como órganos de fijación.

**Repleta.-** agrandamiento o distensión de una garrapata después de una ingestión de sangre. Como el escudo de las garrapatas hembras de la familia Ixodidae es parcial, permite esta distensión. Cuando la garrapata está llena de sangre, el escudo se aprecia como una pequeña placa en la parte anterior del idiosoma. En los Argasidae, el escudo no existe en ambos sexos, por lo que, tanto el macho como la hembra, llegan a agrandarse pero no en la misma proporción que las hembras de las garrapatas duras.

**Surco Anal.-** se presenta en toda la familia ixodidae situado posterior al ano a excepción del género *Ixodes* en el que es preanal.

**Tegumento.-** la cubierta más exterior, llamada también cutícula, del cuerpo de las garrapatas.

**Vestigial.-** rudimentario, de escaso desarrollo.

Una vez que se tiene conocimiento de los nombres de las diferentes estructuras externas de una garrapata, se procede a su identificación. En los cuadros que se anexan pueden identificarse algunas de las partes referidas en este glosario de términos.

Equipo e instrumentos

- 1.- Lámpara para restirador
- 2.- Microscopio estereoscópico o lupa

Materiales

- 1.- Aguja de disección
- 2.- Papel blanco
- 3.- Papel secante
- 4.- Plastilina blanca

Reactivos:

- 1.- Alcohol etílico al 70%

Procedimiento

Una vez eliminado el exceso de líquido conservador, fijar el espécimen en plastilina. Si la garrapata está repleta, es aconsejable extraer su contenido mediante punción de la parte ventral del Idiosoma. El primer reconocimiento deberá iniciarse por la región dorsal, con el auxilio de una lupa o microscopio estereoscópico.

Claves para la identificación de Garrapatas.-

1.- Longitud de pedipalpos.-

- a) Cortos y gruesos. Géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Anocentor*.
- b) Cortos en forma de aisladores de luz. Género *Boophilus*.
- c) Cortos y el segundo par de artejos ensanchados lateralmente en forma de campana. Género *Haemaphysalis*.
- d) Largos y delgados, más largos que la base del gnatosoma y el 2o. par de artejos el doble de largos que de ancho.

Género *Amblyomma*.

- e) Largos, el 2o. y el 3er. par de artejos más o menos de igual medida. Género *Ixodes*.
- f) No visible dorsalmente en ninfas ni adultas y visibles en larvas. Familia *Argasidae*.

2.- Base del Gnatosoma.

- a) De forma cuadrangular. Género *Dermacentor* y *Anocentor*.
- b) De forma hexagonal ensanchada lateralmente. Género *Boophilus* y *Rhipicephalus*.
- c) De forma pentagonal ensanchada en la base y acortado en el vértice. Género *Amblyomma*.
- d) De forma cuadrangular y pequeño. Género *Haemaphysalis*.
- e) De forma pentagonal ensanchada en sus lados. Género *Ixodes*.
- f) No visible dorsalmente. Familia *Argasidae*.

3.- Escudo en hembras.

- a) Pequeño de color café rojizo sin dibujos ornamentales. Género *Boophilus*.
- b) Regular tamaño, con bordes angulados puede presentar muchos o pocos dibujos ornamentales en color blanco verdoso. Género *Dermacentor*.
- c) Ocupa una cuarta parte del total del idiosoma con muchos dibujos ornamentales. Género *Amblyomma* a excepción de las especies *Amblyomma inornatum* y *Amblyomma parvum*.
- d) Pequeño en forma semicircular sin dibujos ornamentales. Género *Ixodes*.
- e) Pequeño, de color café rojizo sin dibujos ornamentales. Género *Anocentor*, *Haemaphysalis* y *Rhipicephalus* (pueden confundirse con *Boophilus*.)
- f) Carecen de escudo. Familia *Argasidae*.

4.- Escudo en Machos.

- a) De color café rojizo. Géneros *Boophilus*, *Anocentor*, *Haemaphysalis* y b) Nada, muchos o pocos dibujos ornamentales en color blanco-verdoso. Género *Dermacentor*.
- b) Abundantes dibujos ornamentales exceptuando las especies *Amblyomma Inornatum* y *Amblyomma parvum*; en colores metálicos, plateado, dorado y blanco verdoso. Género *Amblyomma*.
- c) Carece de dibujos ornamentales siendo de color café oscuro. Género *Ixodes* y *Haemaphysalis*.
- e) Carecen totalmente de escudo. Familia *Argasidae*.

5.- Festones.

- a) Ligeramente marcados ocasionalmente en hembras, y no distinguibles fácilmente en machos. Género *Boophilus*.
- b) Perceptibles a simple vista en machos y hembras poco repletos. Género *Amblyomma*.
- c) Pueden ser muy marcados en algunas especies o poco perceptibles en otras. Géneros *Dermacentor* y *Haemaphysalis* (en hembras repletas no se aprecia).
- d) En número de 7 poco perceptibles. Género *Anocentor*.

e) Poco perceptibles en hembras, perceptibles en machos, presentando un alargamiento y ensanchamiento ligero en el festón central. Género *Rhipicephalus*.

f) Carecen totalmente. Género *Ixodes*.

g) No presentan. Familia *Argasidae*

Estructuras a considerar en la región ventral:-

1.- Base del Gnatosoma:

No existe mucha diferencia de la vista dorsal. Familia *Ixodidae*. Implantación ventral. Familia *Argasidae*.

2.- Pedipalpos:

Al igual que en examen dorsal se ve su forma y longitud. Familia *Ixodidae*. Semejante a patas. Familia *Argasidae*.

3.- Hipostoma:

Tanto en la familia *Ixodidae* como *Argasidae* presenta forma de mazo o de punta de lanza.

4.- Orificio Genital:

Con macho y hembra de *Ixodidae* y *Argasidae*.

Sin ninfas y larvas de *Ixodidae* y *Argasidae*.

5.- Miembros locomotores:

Con tres pares de patas, estadios larvarios de ambas familias.

Con 4 pares de patas, estadios ninfal y adultos en ambas familias.

6.- Distribución de miembros:

a) Implantación a todo lo largo del idiosoma, ocupando 3/4 partes de superficie ventral en casi todos los géneros de la familia *Ixodidae* a excepción del género *Ixodes*, en el que están agrupados en la porción anterior ocupando una cuarta parte.

b) En la familia *Argasidae* están implantados radialmente.

7.- Coxas

a) El primer par de forma triangular apenas perceptible la escotadura en las hembras. Género *Boophilus*.

b) Primer par de coxas bífidas con escotadura profunda presente. Géneros *Amblyomma*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus*.

c) Primer par de coxas con espolón agudo y dirigida su punta a la parte postero-interna del idiosoma. Género *Ixodes* y *Haemaphysalis*.

d) Cuarto par, de coxas sin espolón en machos ni hembras. Género *Boophilus*.

e) Cuarta coxal con espolón perceptible al microscopio, en los machos ésta se encuentra muy desarrollada. Géneros *Dermacentor* y *Anocentor*.

f) Espolón en la cuarta coxal más o menos prominente más constante en machos que en hembras. Género *Amblyomma*.

g) En la cuarta coxa casi siempre presentan espolón. Géneros *Ixodes*, *Haemaphysalis* y *Rhipicephalus*.

h) Sin espolones en las coxas. Familia *Argasidae*.

8.- Placas Adanales y Accesorias:

a) Sumamente desarrolladas, siendo las accesorias ligeramente más cortas, presentándose exclusivamente en machos. Género *Boophilus*

b) Placas adanales bien desarrolladas, accesorias rudimentarias, presentes exclusivamente en machos. Género *Rhipicephalus*.

9.- Prolongación caudal:

a) Se presenta en el borde posterior del idiosoma de los machos.

*Boophilus microplus*

b) Se le considera como prolongación caudal al abultamiento que presenta el 6o. Festón. Género *Rhipicephalus*

10.- Mamelones:

a) Protuberancias quitinizadas localizadas en el ángulo interno de los festones, con excepción del festón central, sumamente desarrollados en hembras. *Amblyomma cajenense*.

b) Moderadamente desarrollados tanto en machos como hembras. *Amblyomma triste*.

Fórmulas para el cálculo de resultados

En esta técnica no se utilizan.

Indices de reproductibilidad y repetibilidad

Se considera de un 95% en técnicos familiarizados con la observación de garrapatas al microscopio.

Bibliografía

Balashov Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) Vector of disease of man and animal. Misc. Public. Entomol. Soc. Am. 8, 1972.

Manual on livestock ticks for animals disease eradication (1965) Division Personnel. USDA.

Núñez, J.L. *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno. Ed. Hemisferio Sur. Argentina 1987.

Krantz, G.W. A manual of acarology. 2a. ed Oregon State University. USA, 1978.

### **Anaplasmosis bovina**

Título.

Prueba de tarjeta para el diagnóstico de *Anaplasma marginale*.

Objetivo

Detectar anticuerpos mediante reacción Inmunológica secundaria de animales previamente expuestos a *A. marginale*.

Campo de aplicación

Este procedimiento tiene aplicación para laboratorios de pruebas que realicen el diagnóstico serológico de la Anaplasmosis bovina causada por *Anaplasma marginale*.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus* spp.

Generalidades

Es una prueba sencilla, fácil de realizar en campo y en laboratorio, con una interpretación objetiva; permitiendo obtener resultados en un mínimo de tiempo y además no requiere de material altamente especializado.

Equipo e instrumentos

Un rotor convencional y tarjetas o placas de vidrio.

Materiales

1.- Micropipetas para 15 y 30 microlitros o tubos capilares para 15 y 20 microlitros

2.- Puntas

3.- Aplicadores de madera y un marcador

Reactivos

1.- Antígeno de *Anaplasma marginale*

2.- Factor Sérico Bovino (FSB)

3.- Suero control positivo y Suero control negativo

Condiciones ambientales

Esta prueba debe realizarse en condiciones medioambientales con temperatura de 22°C a 26°C.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Separar el suero del coágulo mediante centrifugación.

Colocar en viales, identificar y trabajar la muestra.

Si no se procesa la muestra inmediatamente, ésta deberá congelarse a -70 °C.

Acondicionarla a temperatura ambiente para su procesamiento, al igual que los reactivos biológicos.

Procedimiento

1.- En el círculo número uno de la placa se deposita 0.03 ml de suero control positivo, en el dos suero control negativo y en los siguientes los sueros problema.

2.- Con la jeringa en posición vertical se deposita 0.030 ml de factor sérico bovino (FSB) en cada círculo sin mezclarlos.

3.- Agitar suavemente la suspensión de antígeno antes de usarla. Con la jeringa en posición vertical depositar 0.015 ml en cada uno de los círculos de prueba, sin mezclarlos.

4.- Con un palillo limpio y seco mezclar y dispersar cuidadosamente los tres reactivos biológicos, llenando completamente el círculo de prueba.

5.- Se agita la placa en un rotor por 4 minutos de 100 a 110 rotaciones por minuto, evitando que las muestras se mezclen entre sí.

6.- Hacer la lectura inclinando suavemente la placa sobre una fuente de luz blanca con fondo negro.

Fórmulas de cálculo para resultados

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados

Resultado positivo: aglutinación característica desde ligera pero definida, hasta marcada o intensa.

Resultado negativo: no hay aglutinación.

Indíces de reproducibilidad y repetibilidad

95% si se sigue literalmente el método descrito, con reactivos y biológicos semejantes.

#### Bibliografía

Amerault, R.E. and Roby, T.O. A rapid card agglutination test for Bovine anaplasmosis. Journal of American Veterinary Medical Association. 153 (12):1828-1834. 1965.

Christenberry, C.C. and Alley, J.L. And evaluation of the rapid card agglutination test for the anaplasmosis in field diagnosis eradication studies. Proceedings of the United State Animal Health Association. 76:88- 93. 1972.

Rose, J.E. Amerault, T.E. and Roby, T.O. Roles of conglutinin complement and antibody size in card agglutination test for bovine anaplasmosis. American Journal of Veterinary Research. 35: 1147-1150.

#### Título

Fijación de complemento para el diagnóstico de Anaplasmosis.

#### Objetivo

Detección de anticuerpos en un animal previamente infectado con *Anaplasma marginale* mediante la activación de la vía clásica del complemento.

#### Campo de aplicación

Este procedimiento tiene aplicación para laboratorios de pruebas que realicen el diagnóstico serológico de la Anaplasmosis bovina causada por *Anaplasma marginale*.

#### Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus* spp.

#### Generalidades

Esta prueba de mayor sensibilidad que la de tarjeta busca la identificación de Anticuerpos del tipo IgG producto de la exposición del animal al agente. La prueba se realiza bajo condiciones de laboratorio y a diferencia de la de tarjeta no puede ser efectuada en campo.

#### Equipo e instrumentos

- 1.- Baño María
- 2.- Espectrofotómetro luz visible
- 3.- Micropipetas de 10 a 100 y de 100 a 1000  $\mu$ l.
- 4.- Reflector de punto de sedimentación

#### Material

- 1.- Frascos Viales de 3 y 4 ml.
- 2.- Gradillas para tubos de 13 x 100 mm.
- 3.- Microplacas para hemaglutinación
- 4.- Puntas desechables para micropipeta
- 5.- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.

#### Reactivos:

- 1.- Antígeno de *Anaplasma marginale* para fijación de complemento según USDA.
- 2.- Complemento (Suero de Cobayo).
- 3.- Glóbulos rojos de carnero.
- 4.- Hemolisina.
- 5.- Solución amortiguadora de Veronal:  
Acido 5-5 dietil barbitúrico.  
Cloruro de calcio anhidro  
Cloruro de magnesio anhidro  
Cloruro de sodio, 5,5 dietil barbiturato de sodio
- 6.- Solución de Alsever
- 7.- Sueros controles positivo y negativo a anticuerpos contra A. marginale
- 8.- Sueros problema.

#### Condiciones ambientales

Las de cualquier laboratorio de inmunología a temperatura ambiente.

#### Preparación y acondicionamiento de la muestra

Descongelar los sueros o retirar del refrigerador, llevarlos a temperatura ambiente.

#### Procedimiento

Tomar de la muestra problema 100  $\mu$ l., se le adiciona 400  $\mu$ l de solución amortiguadora de Veronal (SAV) logrando una dilución de 1:5.

El ovino seleccionado se sangra 24 horas antes de correr la prueba, la sangre se obtiene con solución de Alsever.

Preparación de los Glóbulos Rojos (Gr) de carnero al 2% con SAV:

a) En tubos graduados de 15 ml se agrega una cantidad de sangre con Alsever, si es necesario se adiciona más Solución Amortiguadora de Veronal (SAV), se centrifuga a 2000 rpm por 10 minutos, transcurrido este tiempo al sedimento de Gr se le retira el sobrenadante así como la fina capa de leucocitos (se sugiere realizar este paso con pipeta para retirar los glóbulos blancos), los Gr se resuspenden con SAV y se centrifugan 2 veces más, pero en la tercera lavada se debe tomar el tamaño del paquete de Gr.

Generalmente se consideran 39 ml de SAV y uno del Paquete de Gr, para obtener una solución al 2%.

b) Para confirmar el paso anterior se lee en un espectrofotómetro. Se toma de la solución al 2% de Gr 0.6 ml y se agregan 3.4 ml de agua destilada para producir lisis de los Gr; se llenan las cubetas del espectrofotómetro y se tiene que leer a 546 nanómetros, deberá utilizarse SAV para ajustar a cero el espectrofotómetro.

Lectura de  $0.600 \pm 0.005$  en la escala de Densidad Optica (DO) son aceptables.

Para corregir la lectura de DO diferentes hay que añadir SAV, el volumen final requerido de la suspensión puede ser determinado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$V2 = \frac{V1 \times DO}{0.600}$$

Donde:

V1: Volumen original de la suspensión de Gr, la cual el espectrofotómetro dará una lectura (DO).

V2: Volumen final requerido para dar una densidad óptica de 0.600

DO: Densidad Optica.

Se diluye el suero 1:5, en tubos de ensaye, donde se agrega 100 microlitros de suero y 400 microlitros de SAV, lo mismo se realiza con los sueros controles positivo y negativo.

Se incuba el suero diluido a 56°C por 30 minutos, en baño María con el fin descomplementar.

Terminada la incubación se retiran del baño María y se toma 25 microlitros del suero descomplementado y se le agregan a los pozos de una microplaca para hemaglutinación, cada suero problema se debe depositar en 2 pozos cercanos y diferentes, dejando toda la columna 12 de la microplaca para los controles.

Posteriormente depositar los sueros problemas en todos los pozos, se agrega el Antígeno (Ag) *Anaplasma marginale* diluido 1:40, 25 microlitros de este Ag a cada primer pozo, dejando el segundo sin Ag.

A los segundos pozos sin Ag se le adiciona 25 microlitros de SAV.

Posteriormente antes de agregar el complemento se debe colocar los controles de nuestra prueba en la columna 12, de la siguiente manera:

| COLUMNA 12 |    |    |      |      |     |     |       |
|------------|----|----|------|------|-----|-----|-------|
| A          | B  | C  | D    | E    | F   | G   | H     |
| Ag         | Ag | Ag | SAV  | SAV  | SAV | SAV | SAV   |
| SAV        | S+ | S- | S+AC | S-AC | SAV | SAV | SAV   |
| C'         | C' | C' | C'   | C'   | C'  | SAV | SAV   |
| SH         | SH | SH | SH   | SH   | SH  | SAV | SAV/G |
|            |    |    |      |      |     |     | R     |

S+: SUERO POSITIVO

S-: SUERO NEGATIVO

SH: SISTEMA HEMOLITICO

C': COMPLEMENTO

SAV: SOLUCION AMORTIGUADORA DE VERONAL

AC: ANTICOMPLEMENTARIOS

GR: GLOBULOS ROJOS

Donde:

A. Control de Antígeno

B. Control de Suero Positivo

C. Control de Suero Negativo

D. Control de Suero Positivo Anticomplementario

E. Control de Suero Negativo Anticomplementario

F. Control del Complemento

G. Control del Sistema Hemolítico

H. Control de los Glóbulos Rojos

Se agrega a todos los pozos 25 microlitros de complemento diluido 1:22, exceptuando a los pozos G12 y H12, los cuales se les adiciona 25 microlitros de SAV.

NOTA: este paso es crítico en la prueba, por lo que se recomienda que realice lo más rápidamente.

Se incuba a 37°C por 60 minutos.

10 minutos antes de finalizar el periodo de incubación, se prepara el sistema hemolítico el cual se lleva a cabo mezclando una parte de suspensión de Gr al 2% más otra parte de hemolisina diluida 1:1500, se deja incubar por 10 minutos.

Transcurridos estos tiempos de incubación, se retiran del baño María tanto las microplacas como el sistema hemolítico, posteriormente se depositan 50 microlitros a cada pozo exceptuando el pozo H12 al cual se le adiciona 25 microlitros de SAV más 25 microlitros de la suspensión de Gr al 2%.

Se incuba 30 minutos a 37°C en baño María.

Interpretación de resultados

POSITIVO: Existe sedimentación de los Glóbulos rojos, Gr, por lo que se observa un punto rojo.

NEGATIVO: Lisis total de los Gr, apariencia transparente

Bibliografía

Manual de Inmunología. Bautista, G.R. y Morilla. Ed. Diana. México 1984.

Kuttler, K.L., DVM, Adams, L. G. and Todorovic R.A. Comparisons of the complement-fixation and indirect fluorescent antibody reaction in the detection of bovine babesiasis. American Journal of Veterinary Research:153-156, 1977

Título

Frotis delgado y grueso de sangre e improntas de órganos para el diagnóstico de Anaplasmosis y Babesiosis bovinas.

Objetivo

Identificar mediante frotis delgado de sangre teñido y observado al microscopio compuesto glóbulos rojos parasitados ya sea por *Anaplasma marginale* o *Babesia* spp.

Campo de aplicación

Este procedimiento tiene aplicación en laboratorios de prueba en materia zoonosanitaria que realizan el diagnóstico directo de hemoparásitos como un apoyo a la Campaña Nacional contra la Garrapata.

Generalidades

Detección de las diferentes formas parásitas en que se presentan *Babesia* spp. y *Anaplasma marginale* dentro de los eritrocitos de la muestra de sangre de bovino previamente infectado en fase aguda.

Documentos conexos a consultarse

NOM-019-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus* spp.

Equipo e instrumentos

- 1.- Contador manual
- 2.- Microscopio compuesto

Materiales

- 1.- Cajas de Koplen
- 2.- Pipetas de 1 y 5 ml
- 3.- Portaobjetos
- 4.- Propipetas
- 5.- Tubos capilares
- 6.- Viales de 10 o 15 ml.

Reactivos

- 1.- Aceite de Inmersión
- 2.- Colorante de Wright o de Giemsa.
- 3.- Metanol

Condiciones ambientales

No son necesarias condiciones especiales.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Mantener la sangre a temperatura ambiente y homogeneizarla antes de tomar la muestra.

Procedimiento

A partir de la muestra de sangre con anticoagulante se elabora un frotis:

Frotis delgado

Utilizar portaobjetos limpios y secos (mantener v/v en alcohol y éter). Se coloca una gota de sangre en el extremo de una laminilla. Con otra laminilla en posición inclinada, colocada en ángulo de 35 grados se hace correr hacia el otro extremo. Al obtener un frotis fino y homogéneo secar inmediatamente al aire y se fija en alcohol metílico absoluto. Para ello la laminilla se coloca de cara hacia arriba y se cubre con el alcohol esperando a que se evapore, posteriormente se aplica la técnica de tinción deseada Giemsa o Wright.

Frotis de gota gruesa

Utilizar portaobjetos limpios y secos, identificar claramente en uno de los extremos con el número de animal y fecha. Colocar en el centro una gota de sangre, mediante un movimiento de rotación formar una película de 1 cm. de diámetro con ayuda de un palillo. Secar al aire o al calor a 50-60 grados centígrados. Teñir con Giemsa o Wright.

Confección de improntas de órganos

Utilizar portaobjetos limpios y secos. Cuidar de no ensuciar el material. Seleccionar un trozo pequeño de órgano. Contactar el portaobjeto con la superficie del órgano recién cortada, donde hay pequeños capilares de sangre. Secar al aire e identificar claramente. Teñir con Giemsa o Wright.

Tinción de Wright

1.- Para conseguir los mejores resultados hay que teñir los frotis en cuanto se hayan secado al aire, sin dejar transcurrir más de una hora y para evitar la precipitación se filtra el colorante antes de usarse.

2.- Colocar el portaobjetos con la muestra hacia arriba

3.- Cubrir el frotis con 1 ml de colorante por 4 minutos.

4.- Virar añadiendo sobre el colorante 2 ml de agua destilada, mezclando homogéneamente para conseguir una mejor tinción y dejar reposar 5 minutos hasta observarse una película metálica verdosa.

5.- Quitar el colorante al chorro de agua (de grifo o destilada) primero suave, luego más fuerte, hasta que haya desaparecido todo exceso de colorante. El lavado durará de 5 a 30 segundos.

6.- El frotis se seca por evaporación. El colorante que haya quedado en el dorso del portaobjetos se limpia con una gasa humedecida con alcohol.

7.- Se observa al microscopio con objetivo de inmersión.

Tinción de Giemsa

1.- Diluir 1:1 el colorante con solución amortiguadora 15 minutos antes de utilizarlo.

2.- Fijar los frotis en metanol absoluto durante 5 minutos. Secar al aire.

3.- Cubrir completamente el frotis con el colorante diluido durante 8 minutos, formándose una película metálica.

4.- Lavar vigorosamente con agua corriente.

5.- Dejar secar.

6.- Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Interpretación de resultados

Resultado positivo: Observación del o los parásitos en sus diferentes fases de desarrollo dentro del eritrocito.

Resultado negativo: Observación de eritrocitos libres de parásitos.

Bibliografía

Hematología Veterinaria. Schalm.

**Babesiosis bovina**

Título

Inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*.

Objetivo

Detectar anticuerpos mediante reacción inmunológica primaria de animales previamente expuestos a *B. bigemina* y *B. bovis*.

Campo de aplicación

Este procedimiento tiene aplicación para laboratorios de pruebas que realicen el diagnóstico serológico de la piroplasmosis bovina causada por *B. bigemina* y *B. bovis*.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus* spp.

Generalidades

Es una prueba sencilla de alta sensibilidad y especificidad, de fácil preparación y conservación del antígeno.

Equipo e instrumentos

1.- Agitador magnético

2.- Balanza granataria

3.- Centrífuga

- 4.- Incubadora
- 5.- Microscopio de inmunofluorescencia
- 6.- Potenciómetro
- 7.- Ultracongeladores

Materiales

- 1.- Balas magnéticas
- 2.- Barniz de uñas
- 3.- Cajas Koplen
- 4.- Cámara húmeda
- 5.- Gradillas metálicas
- 6.- Jeringa automática
- 7.- Jeringa para insulina con aguja del No. 21
- 8.- Marcador
- 9.- Micropipetas
- 10.- Pinzas
- 11.- Portagradillas
- 12.- Puntas
- 13.- Tubos de ensaye

Reactivos

- 1.- Acetona
- 2.- Antígeno de *B. bigemina* y *B. bovis*
- 3.- Azul de Evans
- 4.- Conjugado con fluoresceína
- 5.- Glicerina
- 6.- Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2.
- 7.- Sueros controles positivo y negativo.

Condiciones ambientales.

Esta prueba debe realizarse en condiciones medioambientales con temperatura de 22°C a 26°C sin humedad.

Preparación y acondicionamiento de la muestra:

Separar el suero del coágulo mediante centrifugación, colocarla en viales, identificar y trabajar la muestra.

Si no se procesa la muestra inmediatamente, ésta deberá congelarse a -70°C. Acondicionarla a temperatura ambiente para su procesamiento.

Procedimiento.

1.- Diluciones:

Preparar diluciones 1:50 de los sueros problemas en solución buffer de fosfatos (PBS pH 7.2) y al mismo tiempo los controles + y -.

2.- Preparación de las laminillas:

Las laminillas con antígeno se sacan del ultracongelador (-70°C) y se colocan con la envoltura de aluminio en una estufa de incubación, sin humedad, a 37°C, durante 30 minutos aproximadamente, de manera que queden secas.

Se elimina la cubierta de aluminio y la envoltura de papel.

Las laminillas con antígeno se fijan en acetona absoluta durante 10 minutos en una caja de tinción.

Marcar con cuadros o círculos sobre la cara de la laminilla que contiene el antígeno, con un lápiz de pintura de aceite o con esmalte de uñas (con jeringa y aguja).

Utilizando un cuadro por dilución, se colocan 10 microlitros de cada una de las diluciones preparadas con los sueros control positivo, negativo y problema.

Las laminillas se colocan dentro de una cámara húmeda y se incuban a 37°C, durante 30 minutos.

Con ayuda de una pizeta, los sueros son eliminados mediante un lavado cuidadoso con PBS; las laminillas se colocan en una caja de tinción con PBS y se continúa el lavado durante 5 minutos, enjuagándolos con agua destilada en otra de tinción.

Las laminillas se secan a la estufa de incubación.

Se colocan 10 microlitros de la dilución óptima del conjugado, que contiene azul de Evans 1:10 en cada uno de los cuadros y se repiten los incisos 7, 8 y 9.

Colocar una gota de glicerina diluida 1:10 en PBS pH 7.2 en cada círculo.

Las laminillas se examinan con un microscopio de luz ultravioleta con objetivo 96 X, y con filtro excitador y filtro barrera apropiados para la fluorescencia con Isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Fórmulas cálculo para resultados.

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados.

Resultado positivo: presencia de parásitos fluorescentes específicamente con una coloración verde-amarillenta.

Resultado negativo: ningún parásito fluorescente.

Índices de reproducibilidad y repetibilidad.

95% si se sigue literalmente el método descrito, con reactivos y biológicos semejantes.

Bibliografía

Johnston, L.A.: Pearson, R.D. And Leatch, G. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Babesia argentina* infection in cattle. Australian Veterinary Journal. 49(8): 373-377. 1973.

Callow, L.L.; McGregor, W., Parker, R.J. and Dalgliesh, R.J. Immunity of cattle to *Babesia bigemina* following its elimination from the host, with observation on antibody levels detected by the indirect fluorescent antibody test. Aust. Vet. J., 50: 12-15, 1974.

Kuttler, K.L., DVM, Adams, L.G. and Todorovic R.A. Comparisons of the complement-fixation and indirect fluorescent antibody reaction in the detection of bovine babesiasis. American Journal of Veterinary Research: 153-156, 1977.

### **11. Brucelosis bovina y caprina**

Título

Detección de anticuerpos contra brucelosis por la prueba de tarjeta o rosa de bengala.

Objetivo

Detección de anticuerpos contra cepas lisas de *Brucella* (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*) en sueros de animales sospechosos.

Campo de aplicación

Esta prueba podrá ser realizada únicamente como prueba tamiz en bovinos, caprinos y porcinos.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

Generalidades

Es un procedimiento cualitativo, rápido, de aglutinación macroscópica que se efectúa en una sola dilución y que detecta principalmente anticuerpos IgG1 y en menor grado IgM.

Sirve como prueba tamiz por su alta sensibilidad y permite reducir el número de pruebas diagnósticas necesarias para controlar y/o erradicar la brucelosis en un rebaño o hato. Se fundamenta en que las IgG1 específicas contra *Brucella* todavía actúan a un pH de 3.8, lo que determina la especificidad de la prueba.

Equipo e instrumentos

- 1.- Aglutinoscopio con fondo negro mate e iluminación indirecta interna.
- 2.- Cronómetro.
- 3.- Micropipeta de volumen constante o variable que mida 30 microlitros, con sus respectivas puntillas.
- 4.- Refrigerador doméstico.

Materiales

- 1.- Gotero calibrado a un volumen de gota de 0.03 ml (30 microlitros).
- 2.- Palillos de madera.
- 3.- Pipetas de Bang o pipetas de 0.2 ml (en caso de no contar con micropipeta).
- 4.- Placa de acrílico blanco de las mismas dimensiones del aglutinoscopio.
- 5.- Placa de vidrio o acrílico transparente, preferentemente del tamaño del aglutinoscopio, con cuadrícula de 3 x 3 cm.

- 6.- Puntas para micropipeta.

Reactivos

Biológicos.

- 1.- Antígeno oficial el cual deberá reunir las siguientes características:

- a) Elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*.
- b) Teñido con rosa de bengala amortiguado con ácido láctico.
- c) pH de 3.65 (+/- 0.05).
- d) Concentración celular del 8% para bovinos y cerdos, y del 3% para caprinos y ovinos.

El antígeno puede deteriorarse cuando se retira del refrigerador o si se mantiene a temperatura ambiente por tiempo prolongado; si la prueba se realiza eventualmente en pocas muestras se recomienda hacer pequeñas alícuotas del antígeno para no sacar todo el frasco del refrigerador. Nunca debe congelarse.

2.- Suero testigo positivo.

3.- Suero testigo negativo.

4.- Muestras de suero de animales sospechosos. Los sueros deberán ser frescos o haber sido mantenidos en refrigeración a 4°C, no deben presentar hemólisis ni estar contaminados.

Condiciones ambientales

De laboratorio con temperatura óptima de 22-25 °C.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Los sueros de animales sospechosos deberán ser de preferencia recién obtenidos, conservados en refrigeración y no deberán presentar hemólisis ni contaminación. Asimismo el antígeno y los sueros testigos deben mantenerse en refrigeración a 4°C, para realizar la prueba deben estar a temperatura ambiente, por lo que deben sacarse del refrigerador entre 30 y 60 minutos incluyendo los sueros sospechosos antes de realizar la prueba. La sensibilidad de la prueba se ve afectada por la temperatura a la que se realiza; si el antígeno y los sueros se usan inmediatamente después de sacarlos del refrigerador, la prueba pierde sensibilidad.

Procedimiento

1.- Colocar una gota de 30 microlitros de cada muestra de suero en un cuadro sucesivo de la placa, siguiendo un orden de izquierda a derecha y de arriba abajo. No se recomienda trabajar más de 10 muestras a la vez porque la gota de suero se deshidrata, sobre todo en climas cálidos.

2.- Agitar el antígeno y con el gotero calibrado colocar una gota de 30 ul a un lado de cada gota de suero; esto es recomendable para evitar que empiece la reacción antígeno-anticuerpo antes de realizar la mezcla.

3.- Inmediatamente después de que se agregó la última gota de antígeno, mezclar el suero y el antígeno por rotación con un palillo por suero, a fin de obtener una mezcla homogénea.

4.- Mezclar durante 4 minutos por rotación manual suave de la placa, evitando que las muestras de los cuadros adyacentes se pongan en contacto entre sí.

5.- Proceder a realizar la lectura sobre el aglutinoscopio.

Fórmulas de cálculo para resultados

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados

La lectura debe realizarse, inmediatamente después de efectuar la mezcla por rotación (inciso 4)

La prueba se considera negativa cuando no se observa aglutinación. Se considera positiva, cuando existe cualquier grado de aglutinación, la cual se observa con formación de grumos color rosa.

En esta prueba no existen los sospechosos. Si la prueba es positiva, debe realizarse una prueba complementaria, como la de rivanol o de fijación de complemento.

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor al 95%, si se sigue estrictamente el método descrito.

Bibliografía

Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M.: Techniques for the brucellosis laboratory. Edited by l'Institute National de la Recherche Agropecuaire INRA, París, France, 1988.

Casas Olascoaga, R.: Diagnóstico serológico de la brucelosis. Boletín Técnico, Centro Panamericano de Zoonosis, OPS, OMS, 1975.

Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales.

Corner, L.A.: Bovine brucellosis. Serology. Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases, Subcommittee on Animal Health Laboratory Standards, Australia, 1989.

Título

Detección de anticuerpos contra Brucelosis, por la prueba de precipitación con rivanol.

Objetivo

Detecar anticuerpos específicos contra cepas lisas de *Brucella* (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*) en sueros de animales sospechosos, por la acción química del rivanol sobre las IgM y otras macroglobulinas del suero.

Campo de aplicación

Para efectos de campaña, se recomienda su realización en sueros de bovinos, que previamente resultaron positivos a la prueba de tarjeta.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

Generalidades

Es una prueba serológica complementaria cuantitativa, altamente específica, ya que se basa en la precipitación selectiva de las IgM en el suero por el reactivo de rivanol. Este precipitado se retira por centrifugación y con el sobrenadante se realiza una aglutinación en placa.

Equipo e instrumentos

- 1.- Aglutinoscopio con fondo negro mate e iluminación indirecta interna
- 2.- Centrifuga clínica, como mínimos de 2,000 rpm
- 3.- Cronómetro
- 4.- Micropipeta de volumen variable entre 5 a 80 microlitros.
- 5.- Refrigerador doméstico

Materiales

- 1.- Gotero calibrado a un volumen de gota de 0.03 ml (30 microlitros)
- 2.- Gradilla
- 3.- Palillos de madera
- 4.- Pipetas de 1 ml con graduación de 1/10 en 1/100
- 5.- Pipetas de Bang o pipetas de 0.2 ml. de 1/10 en 1/100
- 6.- Placas de vidrio o acrílico transparente, preferentemente del tamaño del aglutinoscopio, con cuadrícula de 3 x 3 cm
- 7.- Puntas para micropipetas
- 8.- Tubos de vidrio de 12 por 75 mm o 13 x 100 mm.

Reactivos

Biológicos

Antígeno oficial el cual deberá reunir las siguientes características:

- a) Elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*.
- b) Teñido con una mezcla de verde brillante y cristal violeta.
- c) pH de 5.8 a 6.2.
- d) Concentración celular de 4%.

Reactivos y soluciones

Solución de rivanol al 1%, peso sobre volumen (P/V)

El reactivo de rivanol (lactato de 2-etoxi-6,9-diamino acridina) es un derivado del naranja de acridina (colorante), que una vez preparado, debe guardarse en un recipiente estéril y conservarse en refrigeración a 4°C protegido contra la luz, ya sea en frasco color ámbar o cubierto con papel aluminio.

Condiciones ambientales

De laboratorio con temperatura óptima de 22-25°C.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Los sueros sospechosos al igual que el antígeno deben sacarse del refrigerador cuando menos 30 a 60 minutos antes de realizar la prueba, con el propósito de que ambos estén a la misma temperatura del laboratorio al momento de realizar la prueba.

Procedimiento

- 1.- Con las pipetas depositar 0.4 ml de solución de rivanol en un tubo por cada muestra.
- 2.- Utilizando una pipeta o punta por cada suero problema, agregar a cada tubo 0.4 ml de suero.
- 3.- Mezclar de inmediato por agitación del tubo, evitando que el contenido entre en contacto con la piel.
- 4.- Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente por espacio de 20 a 30 minutos.
- 5.- Centrifugar aproximadamente a 2000 rpm por 5 minutos para obtener un paquete a partir del precipitado.
- 6.- Con la micropipeta o con una pipeta de 0.2 ml, medir del sobrenadante 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml (equivalentes a 80, 40, 20, 10 y 5 µl, respectivamente), colocar cada una de dichas cantidades en un cuadro de la placa de vidrio, procurando llevar un orden de izquierda a derecha y de arriba a abajo, dejando un cuadro sin utilizar entre las cinco gotas de una muestra y de las de otra.
- 7.- Con el gotero o micropipeta, agregar 0.03 ml (30 µl) del antígeno a cada una las gotas sobre la placa.
- 8.- Mezclar con palillos, extendiendo cada muestra 2 cm de diámetro aproximadamente.
- 9.- Mezclar por rotación inclinando la placa suavemente hacia un lado y a otro 4 veces. Dejar reposar 6 minutos.
- 10.- Mover la placa nuevamente por rotación suave 4 veces y dejar reposar otros 6 minutos.

11.- Al término del tiempo, agitar la placa por rotación 4 veces más y proceder a realizar la lectura sobre el aglutinoscopio.

Las diluciones corresponden con los títulos como sigue:

| Volumen de la gota | Dilución |
|--------------------|----------|
| 0.080              | 1:25     |
| 0.040              | 1:50     |
| 0.020              | 1:100    |
| 0.010              | 1:200    |
| 0.005              | 1:400    |

Fórmulas de cálculo para resultados

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados

La prueba se considera positiva cuando hay aglutinación de cualquier grado.

La prueba se considera negativa cuando no existe aglutinación.

En animales no vacunados se considera positiva una aglutinación igual o mayor a 1:25 y en animales vacunados se considera positiva una aglutinación igual o mayor a 1:50

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor al 95% si se sigue estrictamente el método descrito.

Bibliografía

Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M.: Techniques for the brucellosis laboratory. Edited by l'Institute National de la Recherche Agropecuaire INRA, París, France, 1988.

Casas Olascoaga, R.: Diagnóstico serológico de la Brucelosis. Boletín Técnico, Centro Panamericano de Zoonosis, OPS, OMS, 1975.

Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales.

Título

Detección de anticuerpos contra la Brucelosis por la prueba de fijación de complemento.

Objetivo

Determinar títulos de anticuerpos fijadores del complemento contra cepas lisas de *Brucella* spp. presentes en el suero.

Campo de aplicación

Esta prueba sirve como prueba confirmatoria en sueros de bovinos, caprinos, ovinos u otras especies que determine la Secretaría.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

Generalidades

La prueba de fijación de complemento ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico confirmatorio de la Brucelosis en las diferentes especies animales, debido a su gran sensibilidad y especificidad. Es capaz de detectar el isotipo IgG1; por esta razón resulta más precisa comparativamente con otras técnicas serológicas y el diagnóstico bacteriológico. Se considera determinante en el diagnóstico confirmatorio de los sueros positivos a la prueba de tarjeta con antígeno teñido con rosa de bengala.

Es una prueba serológica rápida y muy sensible. Se basa en la activación del complemento por la vía clásica, en donde es necesaria la presencia de una unión antígeno anticuerpo para iniciar la reacción (fase invisible). Cuando existen anticuerpos contra brucela, se da la reacción antígeno anticuerpo y el complemento se une a esta reacción (Ag-Ac-C'), siendo incapaz de unirse al sistema hemolítico, que es un segundo sistema antígeno anticuerpo (fase visible), observándose una sedimentación de los glóbulos rojos con anticuerpos o hemolisina. En ausencia de anticuerpos contra brucela en el primer sistema durante la fase invisible, el complemento queda libre, uniéndose al segundo sistema antígeno anticuerpo o sistema hemolítico, observándose una hemólisis.

Equipo e instrumentos

1.- Baño María con escala de 15°C a 75°C.

2.- Centrífuga clínica.

3.- Congelador de 0 a -20°C para conservar el complemento liofilizado.

Si se utiliza el complemento sin liofilizar, la temperatura debe ser de -35 a -70°C.

4.- Espectrofotómetro con rango mínimo de 340 a 600 nm de longitud de onda.

5.- Micropipeta multicanal con volumen ajustable de 10 a 100 microlitros.

6.- Cronómetros.

Materiales

- 1.- Gradillas
- 2.- Matraces aforados
- 3.- Matraces Erlenmeyer
- 4.- Microplacas con 96 pozos de fondo en U
- 5.- Pipetas serológicas de volumen variable
- 6.- Pizetas de plástico
- 7.- Puntas para micropipetas
- 8.- Tubos de ensayo

Reactivos. Todos los reactivos deben ser grado analítico

- 1.- Acido cítrico
- 2.- Acido clorhídrico
- 3.- Agua destilada
- 4.- Citrato de sodio
- 5.- Cloruro de calcio
- 6.- Cloruro de magnesio
- 7.- Cloruro de sodio
- 8.- Dietilbarbiturato de sodio
- 9.- Glucosa anhidra

Soluciones

a) Solución concentrada de calcio y magnesio

Cloruro de magnesio hexahidratado 20.33 g

Cloruro de calcio dihidratado 4.41 g

Disolver con agua destilada en matraz aforado de 100 ml. Mezclar y distribuir en viales y conservar en refrigeración.

b) Solución salina amortiguada con veronal sódico y ácido clorhídrico concentrada 5x

Cloruro de sodio 83.00 g

Dietilbarbiturato de sodio 10.19 g

Acido clorhídrico 1 N 34.58 ml

Sol. concentrada de Ca y Mg 5 ml

Agua destilada c.b.p. 2,000 ml

Llevar 1,500 ml de agua destilada a un matraz aforado de 2,000 ml. Agregar 83 g de NaCl y disolver; agregar 10.19 g de 5,5-dietilbarbiturato de sodio y disolver. Agregar 34.58 ml de HCl 1 N y mezclar por agitación. Agregar 5 ml de solución concentrada de calcio y magnesio. Aforar con agua destilada.

Diluir 1 ml de la solución salina con 4 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.3-7.4. Conservar la solución 5x en refrigeración y para usarla diluir un volumen de la solución con 4 volúmenes de agua destilada y determinar el pH (7.3-7.4).

c) Solución de Alsever (anticoagulante y preservativo para la sangre)

Glucosa anhidra 1.866 g

Cloruro de sodio 0.418 g

Citrato de sodio 0.800 g

Acido cítrico 0.055 g

Agua destilada 100 ml

Disolver en matraz aforado de 100 ml y aforar con agua destilada. Esterilizar por filtración con membrana de 0.45 um o en autoclave a 10 lbs durante 10 minutos. Distribuir en tubos.

Biológicos

1) Antígeno autorizado a base de *Brucella abortus* cepa 1119-3 sin teñir, con pH de 6.8 a 7.0 y concentración celular de 4.5%.

2) Suspensión de glóbulos rojos de carnero al 3%

Para su estandarización, obtener los eritrocitos de ovinos sanos y en buen estado nutricional, por venopunción yugular con agujas calibre 21G, 20G o 18G. Al extraer la sangre, vaciarla evitando la hemólisis en un volumen igual de solución de Alsever. Lavar los eritrocitos antes de utilizarlos por medio de tres centrifugaciones de 1,000 g por 10

minutos, descartando el sobrenadante y usando diluyente entre cada lavado. Utilizar el paquete final para preparar una suspensión de eritrocitos al 3%.

Para determinar el volumen del paquete celular agregar 32.3 ml de diluyente por cada ml del paquete de eritrocitos, obteniéndose una suspensión de aproximadamente 3% de concentración. Corroborar tomando 1 ml de esta suspensión y agregándole 15 ml de agua destilada. Agitar para lograr una hemólisis completa y leer el sobrenadante en el espectrofotómetro a 540 nm debiéndose obtener una densidad óptica de 0.5.

3) Elaboración, conservación y titulación de la hemolisina

Elaboración.- La hemolisina puede elaborarse en el laboratorio, bajo diferentes esquemas de inmunización u obtenerse en forma comercial.

Conservación.- Si la hemolisina es elaborada en el laboratorio donde se va a llevar a cabo la prueba, una vez obtenida, nunca debe congelarse sola. Se enlistan tres formas de conservación de la hemolisina.

a) Congelada. Una vez obtenido el suero debe mezclarse con glicerina volumen sobre volumen (v/v) y mantenerse en congelación. La glicerina ayuda a mantener el título, funcionando como conservador.

b) Liofilizada. Debe mantenerse en refrigeración entre 4 y 6°C; una vez resuspendida, se mezcla con glicerina (v/v) y se mantiene en congelación (-20°C).

c) Refrigerada con fenol 1:20, con la mezcla que se propone a continuación:

- 94 ml de solución amortiguada
- 2 ml de hemolisina conservada en glicerina
- 4 ml de fenol 1:20 (diluido con la solución amortiguada)

Cuando la hemolisina no se encuentre en glicerina, se diluirá 1 ml en 95 ml de solución amortiguada. Debe agitarse diariamente durante 10 días antes de utilizarla.

Titulación

a) Preparar una suspensión de eritrocitos de carnero al 3%.

b) Preparar una dilución madre 1:100 de hemolisina y mantenerla en refrigeración.

c) Realizar una dilución doble seriada con un volumen final de 1 ml en 6 tubos, comenzando con una dilución 1:500 de la siguiente manera:

| tubo 1                           | tubo 2                           | tubo 3                            | tubo 4                            | tubo 5                            | tubo 6                            |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1:500                            | 1:1,000                          | 1:2,000                           | 1:4,000                           | 1:8,000                           | 1:16,000                          |
| 1.6 ml                           | 1.0 ml                           | 1.0 ml                            | 1.0 ml                            | 1.0 ml                            | 1.0 ml                            |
| solución<br>amortiguada          | solución<br>amortiguada          | solución<br>amortiguada           | solución<br>amortiguada           | solución<br>amortiguada           | solución<br>amortiguada           |
| 0.4 ml de<br>hemolisina<br>1:100 | 1.0 ml de<br>hemolisina<br>1:500 | 1.0. ml de<br>hemolisina<br>1:000 | 1.0 ml de<br>hemolisina<br>1:2000 | 1.0 ml de<br>hemolisina<br>1:4000 | 1.0 ml de<br>hemolisina<br>1:8000 |

d) Desechar 1.0 ml del tubo número 6 para tener 1.0 ml del volumen final en todos los tubos.

e) Agitar suavemente la suspensión de eritrocitos previamente elaborada, para que esté homogénea y añadir 1.0 ml de ésta a cada uno de los tubos que contienen las diluciones de hemolisina. Dejar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos, para que pueda producirse la sensibilización de los eritrocitos, con agitación lenta periódicamente.

f) Preparar una dilución de complemento 1:300 en 10 ml.

g) Preparar dos series de tubos y marcarlas con las diluciones de hemolisina (1:500, 1:1000, 1:2000, etc.).

h) Agregar a todos los tubos 1.0 ml de diluyente frío y 0.5 ml de complemento diluido 1:300.

i) De los tubos que contienen la hemolisina en distintas diluciones (con los eritrocitos, ver incisos d) y e); transferir 0.5 ml de cada dilución al tubo correspondiente que contiene complemento y diluyente, ver incisos g) y h).

j) Incubar las series de tubos durante 30 minutos a 37°C en Baño María. Agitar suavemente a los 15 minutos.

k) Retirar los tubos del Baño María.

l) Calcular el porcentaje de hemólisis al 50%. Se pueden utilizar dos métodos, uno con ayuda de un espectrofotómetro y otro con un patrón de hemólisis.

Con el espectrofotómetro:

Añadir a todos los tubos 2 ml de diluyente frío y centrifugar a 1000 G por 5 minutos. Se debe utilizar una longitud de onda de 540 nm y medir la absorbancia de la muestra. Aplicar la siguiente fórmula:

Cálculo del % de hemólisis

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{DO1 \times 100}{DO2}$$

Donde:

DO1 es la densidad óptica obtenida en cada uno de los tubos de la titulación (absorbancia)

DO2 es la densidad óptica obtenida en la estandarización de eritrocitos al 3% (absorbancia)

Ejemplo:

Estandarización de eritrocitos, lectura de tubo DO2 de 0.500

Titulación de hemolisina, lectura del tubo (x) DO1 de 0.400

Cálculo del porcentaje de hemólisis:

$$\% \text{ de hemólisis } = \frac{0.40 \times 100}{0.500} = 80\% \text{ de hemólisis}$$

0.500

Nota: debe calcularse el porcentaje de hemólisis que corresponda a cada uno de los 6 tubos de la titulación de hemolisina.

Con un patrón de hemólisis:

Centrifugar a 1000 G por 5 minutos (no se debe añadir diluyente frío). Para simular diversos grados de hemólisis mezclar:

(A) una suspensión de eritrocitos de carnero con

(B) una solución de eritrocitos lisados

Preparar la suspensión de eritrocitos (A) agregando 1 ml de una suspensión de eritrocitos al 3% a 7 ml de diluyente a la concentración de uso.

Para preparar la solución de eritrocitos (B): como la solución amortiguadora de trabajo se encuentra a razón de 5 (5x), mezclar 1 ml de la suspensión de eritrocitos al 3% con 5.6 ml de agua destilada, se agita hasta que la hemólisis sea completa y agregar entonces 1.4 ml de diluyente para restablecer la tonicidad.

Preparar a continuación los patrones para los diferentes grados de hemólisis, entre 0% y 100%, mezclando la suspensión (A) con la solución (B) en las proporciones que se indican a continuación:

|                    | 0%  | 10% | 20% | 30% | 40% | 50% | 60% | 70% | 80% | 90% | 100% |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Suspensión A en ml | 1.0 | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0    |
| Suspensión B en ml | 0   | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1    |

Una vez preparadas las muestras se deben centrifugar los tubos, a 1,000 G por 5 minutos.

Para calcular el porcentaje de hemólisis en los tubos de la titulación se deben comparar éstos con el tubo patrón.

m) Señalar los porcentajes de hemólisis obtenidos en cada tubo utilizando papel semilogarítmico. En el eje de las abscisas (X) marcar la dilución correspondiente, y en el de las ordenadas (Y) el porcentaje de hemólisis. Unir los puntos entre sí mediante una línea continua para obtener una gráfica.

n) Buscar el punto de las ordenadas que corresponda al 50% de hemólisis, y proyectarlo al cruce con la abscisa. El punto que marque en el eje de las abscisas (x) corresponderá a la dilución en que se encontraría una unidad 50% de hemólisis (1 UHC50%).

o) Para trabajar con 4 unidades 50% de hemólisis debe concentrarse 4 veces la dilución obtenida. Por ejemplo: si una unidad hemolítica 50% se encuentra en la dilución 1:5000, se divide 5000 entre 4 = 1250, quedando la dilución de trabajo como 1:1250.

#### 4) Complemento

Preparación y conservación del complemento

Sangrar por lo menos 4 cobayos, separar lo antes posible el suero del coágulo, centrifugarlo y mezclarlo para preparar el complemento. El complemento puede ser liofilizado o deshidratado y debe almacenarse en congelación al menos a -20°C.

Titulación del complemento

a) Sensibilizar eritrocitos mezclando volúmenes iguales de hemolisina previamente titulados con 4UH50% y eritrocitos al 3%. Dejar la mezcla en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente y mezclar periódicamente.

b) Preparar dilución madre 1:10 de complemento, dejar en reposo de 15 a 20 minutos en refrigeración (4-8°C) y preparar la dilución de titulación del complemento 1:300.

c) La prueba se realiza al doble del volumen normal para reducir al mínimo los errores de utilización de pipetas y conseguir un volumen total suficientemente grande para permitir la lectura en el espectrofotómetro. Disponer 6 tubos en una gradilla y agregar los reactivos en las cantidades y el orden indicados en el siguiente cuadro.

Tubos 1 2 3 4 5 6 Complemento 1:3000.30.40.50.60.70.8 Diluyente 1.21.1.1.00.90.80.7 Eritrocitos sensibilizados 0.50.50.50.50.50.5

d) Mezclar el contenido de cada tubo agitándolo suavemente e incubar en Baño María a 37°C durante 30 minutos, agitándolos cada 15 minutos. Después de sacar los tubos del baño agregar 2 ml de diluyente frío a cada tubo y centrifugar 5 minutos a 1000 G para sedimentar las células intactas. Determinar sus densidades ópticas (D.O.) en el espectrofotómetro o por comparación con patrones de hemólisis (en este último caso no agregar el diluyente frío).

e) Calcular los valores de la expresión  $y/(100-y)$  para cada cantidad de complemento, a partir del porcentaje de hemólisis (considerar solamente los tubos que presenten una hemólisis del 10 al 90%); el cálculo se hace como en los ejemplos del cuadro.

CALCULO DE LA EXPRESION  $Y/(100-Y)$

VOLUMEN DE COMPLEMENTO DENSIDAD OPTICA PORCENTAJE DE HEMOLISIS (Y)  $Y/(100-Y)$   
 0.30.041100.110.40.112280.360.50.208521.080.60.288722.570.70.328824.530.80.337845.34

Para reducir la cantidad de cálculos necesaria, conviene realizar un cuadro en el que se indique:

- A) El porcentaje de hemólisis
- B) La expresión  $y/(100 - y)$  para cada lectura fotométrica comprendida entre el 10% y el 90% de hemólisis.
- f) En un papel logarítmico con abscisas y ordenadas logarítmicas marcar los siguientes valores:

En las ordenadas se marca el volumen de complemento y en las abscisas al % de hemólisis (expresado como  $y/(100 - y)$ ). Unir los puntos entre sí para obtener una recta. El punto donde la recta cruza la línea del valor en las abscisas corresponde al volumen de complemento que produce el 50% de hemólisis 1 unidad hemolítica 50% (UHC50%).

g) En el ejemplo 1 UHC50% corresponde a 0.48 ml de complemento previamente diluido 1/300. la prueba se realiza con 5 UHC50%; si se multiplica este volumen por cinco ( $0.48 \times 5$ ), resulta el volumen de complemento que contiene 5UHC50%.

A continuación se debe calcular la dilución necesaria del complemento para realizar la prueba, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{D.C.}{V.C.} = \frac{X}{V.T.} \quad X = \frac{D.C.}{V.C.} \times V.T.$$

Donde:

- D.C.= factor de dilución del complemento con el que se hizo la titulación (300)
- V.C.= volumen de complemento en el que se tienen las 5UHC50% (2.4)
- V.T.= volumen de complemento que se utilizó para las titulación (0.5)
- X = dilución requerida.

Sustituyendo los valores del ejemplo:

$$\frac{300}{2.4} = \frac{x}{0.5} \quad 125 = \frac{x}{0.5} \quad X = (125)(0.5) = 62.5$$

La dilución necesaria es 1:62.5, para cualquier volumen requerido.

La dilución de trabajo se puede realizar a partir del complemento diluido 1:10, o del complemento sin diluir. Si se va a preparar a partir de la dilución 1:10, la dilución de trabajo será 1:6.2. Se calcula el volumen necesario para la prueba y se hace la dilución.

Ejemplo:

Si se necesitan 15 ml de complemento:

$$\text{Complemento (C')} = \frac{\text{Volumen}}{\text{Factor de dilución}}$$

$$C = \frac{15 \text{ ml}}{62} = 0.24 \text{ ml}$$

Se necesitan 0.24 ml de complemento y 14.76 ml de diluyente

o bien:

$$\frac{15}{6.2} = 2.4 \text{ ml de complemento y } 12.6 \text{ ml de diluyente}$$

Condiciones ambientales

De laboratorio a temperatura óptima entre 18-25°C.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Los sueros deberán conservarse en refrigeración o congelación. No se deberán procesar sueros hemolizados y/o contaminados.

Diluir cada suero 1:5 en tubos de ensayo e inactivar a 60°C por 30 minutos.

Procedimiento

Técnica en microplaca

Previamente haber preparado los glóbulos rojos de carnero sensibilizados al 3%. Diluir el complemento a la dilución de trabajo de acuerdo a la titulación. Diluir el antígeno 1:200 y realizar la dilución de los sueros problema.

Utilizar los sueros diluidos previamente. Incluir un suero positivo y uno negativo en cada serie de trabajo.

Emplear una columna de 8 pozos por cada suero en la microplaca. Colocar en los pozos A, B y H 25 µl del suero diluido e inactivado. En los pozos B a H agregar 25 µl de diluyente.

Con una pipeta multicanal de 12 canales efectuar la dilución de los sueros, mezclando cinco veces el contenido de los pozos B, vaciar totalmente y medir 25 µl que se extraen y se transfieren a la hilera C, mezclar cinco veces, tomar 25 µl y transferir a la hilera D. Repetir hasta la fila G, mezclar y desechar 25 µl finalmente. Cambiar las puntas de las micropipetas para diluir los sueros de cada placa. Las diluciones finales quedan como sigue: 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320.

Agregar a todos los pozos 25 µl del antígeno. Los pozos de la hilera H no llevan antígeno, sirven como testigos del suero. Agregar a todos los pozos 25 µl de complemento. Preparar en este momento una serie de 5 pozos controles de la reacción, como sigue:

|                    |                                    |
|--------------------|------------------------------------|
| CONTROL DE:        | REACTIVOS (25 µl de c/u)           |
| Antígeno (A)       | Diluyente, antígeno, complemento   |
| Complemento (C')   | 2 de diluyente, complemento (C')   |
| Complemento (C'')  | 2 de diluyente, complemento (C'')  |
| Complemento (C''') | 2 de diluyente, complemento (C''') |
| Hemolisina (H)     | 3 de diluyente                     |

C' = dosis de complemento empleada en la prueba

C'' = dosis de complemento diluida 1:2

C''' = dosis de complemento diluida 1:4

Incubar los pozos de la reacción a 37°C durante 30 minutos. Al término de la incubación, agregar 25 µl de glóbulos rojos sensibilizados. Incubar nuevamente a 37°C durante 30 minutos agitando a los 10 y a los 20 minutos. Dejar reposar en refrigeración durante 2 horas. Realizar la lectura con ayuda de un espejo lector.

Fórmulas de cálculo para resultados

En esta técnica no se utilizan

Interpretación de resultados

Los resultados se interpretarán como sigue:

|                   |               |
|-------------------|---------------|
| 0% de hemólisis   | Positiva ++++ |
| 25% de hemólisis  | Positiva +++  |
| 50% de hemólisis  | Positiva ++   |
| 75% de hemólisis  | Positiva +    |
| 100% de hemólisis | Negativa      |

Se consideran títulos positivos a la dilución correspondiente desde 0% de hemólisis hasta 75% de hemólisis.

Para bovinos los títulos se consideran positivos desde 1:10 y para ovinos y caprinos desde 1:5.

Índices de reproducibilidad y repetibilidad

Esta prueba tiene un índice de reproducibilidad mayor al 95% si se sigue el método descrito.

Bibliografía o referencias

Alton, G.G.; Jones, L.M. Angus, R.D. and Verger, J.M. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut Nationale de la Recherche Agronomique, Paris, 1988.

García Carrillo, C.: Prueba de fijación de complemento para el diagnóstico de la brucelosis. Centro Panamericano de Zoonosis. Nota Técnica No. 24, Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de la Salud, Buenos Aires, Argentina, 1981.

Título

Prueba de anillo en leche o anillo de Bang

Objetivo

Detección de anticuerpos contra brucelas lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) en leche de vacas infectadas. Esto se detecta cuando se desarrolla el complejo antígeno anticuerpo y se adhiere al glóbulo de grasa de la leche formando un anillo coloreado en la superficie.

#### Campo de aplicación

Esta es una prueba de vigilancia epidemiológica en leche de vacas. No es útil en leche de cabras ni borregas porque no se forma un anillo teñido en la superficie, sino que la coloración es desigual. La podrán realizar personal de laboratorios aprobados o bien Médicos Veterinarios Aprobados en Tuberculosis y Brucelosis que hayan pasado previamente un examen de aptitud establecido por la Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis.

Es una prueba de diagnóstico primario que detecta la presencia de leche positiva de una vaca infectada cuando se ha diluido con leche de animales no infectados, por lo que sirve para detectar hatos potencialmente infectados. Se requieren muestras de leche cruda fluida y fresca.

#### Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

#### Generalidades

Es un procedimiento práctico, rápido y económico para detectar hatos lecheros infectados y para la vigilancia de los que están exentos de la enfermedad. Se debe efectuar 3 a 4 veces al año combinando muestras de leche de colectores grandes y luego realizando pruebas individuales. Se ha utilizado como prueba de vigilancia epidemiológica en países o regiones donde se ha establecido un control de la brucelosis bovina. Es una prueba muy sensible que permite reducir el número de pruebas diagnósticas necesarias para controlar y/o erradicar la Brucelosis en un rebaño o hato.

El desarrollo de una reacción positiva depende de lo siguiente:

- a) Una aglutinina del glóbulo de grasa que se encuentra presente en la leche normalmente forma agregados con los glóbulos de grasa que suben a la superficie. Esta es la capa de crema normal de la leche de vaca.
- b) Las células de *Brucella* teñidas que se agregan como antígeno se aglutinan si existen anticuerpos contra *Brucella* presentes en la leche. Estas células teñidas en forma de agregados se adhieren a la superficie de los glóbulos de grasa y suben a la superficie junto con ellos para formar una capa de crema de color azul.

#### Equipo e instrumentos

- 1.- Baño María o estufa bacteriológica a 37°C
- 2.- Cronómetro
- 3.- Refrigerador doméstico

#### Materiales

- 1.- Gotero calibrado a un volumen de gota de 0.03 ml (30 µl).
- 2.- Tubos de vidrio de 13 x 100 mm.
- 3.- Pipetas de vidrio de 1 ml.
- 4.- Gradilla.

#### Para el usuario:

- 1.- Bata

#### Reactivos

1.- Antígeno oficial el cual deberá reunir las siguientes características:

- a) Elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, inactivada con fenol al 0.5% P/V
- b) Teñido con hematoxilina.
- c) pH de 4.0 a 4.3
- d) Concentración celular del 4%

#### Material biológico

Muestras de leche de hatos lecheros sospechosos de estar infectados con *Brucella* spp. obtenidas de tanques mezcladores o enfriadores.

#### Condiciones ambientales

La prueba debe realizarse a temperatura ambiente entre 22-25°C

#### Preparación y acondicionamiento de la muestra

Deben tenerse las siguientes precauciones cuando se pruebe una muestra de leche:

- a) Un muestreo incorrecto puede conducir a un contenido insuficiente o excesivo de crema, lo que interferirá con la lectura de la prueba.
- b) La agitación excesiva de la leche desnaturaliza a la "aglutinina del glóbulo de grasa", y afecta la capa de crema de la superficie.

c) Cuando la leche se calienta a 45°C o más se reduce el contenido de anticuerpos contra Brucella.  
 d) La leche puede almacenarse hasta 72 horas a temperatura de refrigeración (2-5°C) sin una pérdida de reactividad importante. Periodos más largos y/o temperaturas de almacenamiento más altas pueden ocasionar pérdida de anticuerpos. Las leches congeladas pueden dar resultados falsos.

e) No es útil en leche homogeneizada ni pasteurizada

Reacciones falsas positivas.- Estas pueden ocurrir cuando la prueba se realiza en:

a) Leche recientemente ordeñada (debe refrigerarse al menos por 12 horas antes de realizar la prueba, y hasta 72 horas inclusive)

b) Leche de vacas con mastitis

c) Leche que contenga calostro o sangre

d) Leche de vacas en periodo de secado

e) Leche de vacas en lactación, no infectadas, que hayan sido vacunadas dentro de los 3 meses anteriores al muestreo, con vacuna cepa 19

El antígeno y la leche sospechosa deben mantenerse en refrigeración a 4°C. Para realizar la prueba deben estar a temperatura ambiente, por lo que deben sacarse del refrigerador entre 30 y 60 minutos antes de realizar la prueba. La sensibilidad de la prueba se ve afectada por la temperatura a la que se realiza; si el antígeno y la leche se usan inmediatamente después de sacarlos del refrigerador, la prueba pierde sensibilidad.

**Antígeno**

El antígeno puede deteriorarse cuando se retira del refrigerador o si se mantiene a temperatura ambiente por tiempo prolongado; si la prueba se realiza eventualmente en pocas muestras se recomienda hacer pequeñas alícuotas del antígeno para no sacar todo el frasco del refrigerador. Nunca debe congelarse el antígeno porque se rompe la suspensión celular.

**Procedimiento**

- 1.- La muestra de leche y el antígeno deben estar a temperatura ambiente al momento de realizar la prueba.
- 2.- Mezclar la leche del tubo o frasco de muestra para dispersar la crema.
- 3.- Transferir 1 ml de la leche sospechosa a un tubo de 13 x 100 mm.
- 4.- Agregar una gota de 0.03 ml (30 microlitros) del antígeno al tubo, tape el tubo y agite suavemente invirtiendo el tubo varias veces.
- 5.- Dejar reposar el tubo 1 minuto para verificar si el antígeno quedó adecuadamente mezclado con la leche.
- 6.- Incubar a 37°C por una hora ya sea en Baño María o en estufa bacteriológica.
- 7.- La lectura se realiza por observación directa del color ya sea del anillo de crema o del tubo de leche.

**Fórmulas de cálculo para resultados**

No existen fórmulas para la obtención de resultados en esta prueba. Sin embargo, para que la sensibilidad de la prueba sea la misma entre hatos de diferente tamaño, se recomienda ajustarse al siguiente cuadro para la realización de la prueba. Se debe considerar que en los hatos de más de 900 vacas, se deben hacer pruebas en grupos de 900 vacas máximo:

**Número de vacas en el hato a probar**

Lactando 1 a 4 Hacer un "pool" o mezcla y probar 1 ml del mismo. Probar la leche de cada vaca cuando la dilución 1:10 del pool resulte positiva. 5-200 Probar 1 ml 201-500 Usar 2 ml para la prueba 501-900 Usar 3 ml para la prueba 901 o más Tomar una muestra de modo que no se tome leche de más de 900 vacas por muestra a probar.

\* Siempre se agrega una gota de 30 microlitros por prueba.

**Interpretación de resultados**

| ANILLO DE CREMA        | COLUMNA DE LECHE      | RESULTADO |
|------------------------|-----------------------|-----------|
| Azul                   | Blanca                | ++++      |
| Francamente coloreado  | Ligeramente coloreado | +++       |
| Medianamente coloreado | Ligeramente coloreado | ++        |
| Mismo color            | Mismo color           | +         |
| Blanco coloreado       | Francamente           | (-)       |

Cualquier lectura positiva, se debe considerar como sospechosa a Brucelosis.

**Indices de reproducibilidad y repetibilidad**

Esta prueba tiene un índice de reproducibilidad mayor al 95% si se sigue el método descrito.

**Bibliografía**

Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M.: Techniques for the brucellosis laboratory. Edited by l'Institute National de la Recherche Agronomique, INRA, París, France, 1988.

Casas Olascoaga, R.: Diagnóstico serológico de la brucelosis. Boletín Técnico, Centro Panamericano de Zoonosis, OPS, OMS, 1975.

Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la brucelosis en los animales.

Corner, L.A. Bovine brucellosis. Serology. Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases, Subcommittee on Animal Health Laboratory Standards, Australia, 1989.

## **12. Rabia**

Título

Prueba de Inmunofluorescencia directa para diagnóstico de Rabia.

Objetivo

Detectar la presencia de virus rábico por medio de la prueba de inmunofluorescencia directa (IF-D).

Campo de aplicación.

Esta prueba se realiza para confirmar o descartar la presencia del virus de la rabia, en muestras de animales con diagnóstico clínico y/o sospechosos de la enfermedad.

Documentos conexos a consultarse.

1.- Manual de técnicas de diagnóstico virológico, F.A.O.

2.- NOM-011-SSA2-1993. Norma Oficial Mexicana para la Prevención y Control de la Rabia.

Generalidades

Determinar la presencia del virus de la rabia a través de la IF-D para diagnóstico de rabia se basa en la utilización de anticuerpos específicos contra el virus rábico, teñidos con un colorante fluorescente (conjugado), el que al unirse con el antígeno respectivo puede ser observado con un microscopio para fluorescencia.

Equipo e instrumentos

1.- Autoclave.

2.- Congelador con temperatura de al menos -20°C.

3.- Estufa bacteriológica.

4.- Microscopio de fluorescencia.

5.- Ultracongelador y/o termo para nitrógeno líquido.

6.- Refrigerador con congelador integrado.

Materiales

1.- Abatelenguas de madera exentos de cera.

2.- Barniz para uñas o pluma marcadora.

3.- Caja para portaobjetos con perforaciones en la tapa (cámara húmeda).

4.- Charolas para enjuague.

5.- Cubreobjetos de 24 x 50 mm.

6.- Jarras de Coplin o recipientes para tinción.

7.- Jeringas de 1 ml y de tuberculina.

8.- Lápiz de grafito.

9.- Papel filtro.

10.- Pinzas.

11.- Portaobjetos.

12.- Tijeras.

13.- Tubos de ensayo.

Reactivos

1.- Acetona.

2.- Agua destilada estéril.

3.- Glicerina.

4.- Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), pH 7.6.

Biológicos

1.- Conjugado antirrábico.

2.- Portaobjetos con impresiones de tejido nervioso positivo y negativo al virus rábico.

3.- Suspensión de cerebro de ratón normal al 20% (SCN).

4.- Suspensión de cerebro de ratón infectado con virus estándar de confrontación al 20% (CVS) o nucleoproteína de células infectadas con rabia al 20%.

Preparación de la solución salina amortiguada con fosfatos (PBS).

a) Soluciones concentradas:

- Solución I:

0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (14.2 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro en 1 litro de agua destilada o 26.8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O en 1 litro de agua destilada).

- Solución II:

0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (13.8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O en 1 litro de agua destilada).

- Solución III:

8.5% NaCl 85 g NaCl en un litro de agua destilada.

Conservar estas soluciones entre 4 y 8°C.

b) Solución de trabajo

91.5 ml. solución I

8.5 ml. solución II

100.0 ml. solución III

800.0 ml. agua destilada

Preparación del Medio de montaje

50 ml de Solución buferada de trabajo

50 ml de glicerol

Condiciones ambientales

Temperatura óptima de 18 a 22°C en un lugar exclusivo para el diagnóstico de rabia.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Las muestras deben ser frescas, refrigeradas, congeladas o estar conservadas en una solución de glicerina al 50% en agua. Estas últimas deberán lavarse con PBS 3 veces con intervalos de 10 minutos.

Las muestras congeladas deben descongelarse previamente a la elaboración de las improntas.

Absorción del conjugado.

Diluir el conjugado a la concentración óptima para el microscopio que vaya a utilizar.

Adicionar CVS y SCN al conjugado durante 30 minutos, para permitir la absorción. Preparar alícuotas para su posterior utilización, conservadas en congelación.

Procedimiento

a) Preparación de impresiones o improntas del tejido a partir de las siguientes regiones del encéfalo:

- caninos y felinos: cerebelo, bulbo raquídeo y asta de Amón.
- rumiantes: trígono olfatorio, cerebelo y bulbo raquídeo.
- quirópteros: corte transversal del cerebro completo.

En el extremo de un abatelenguas se coloca un trozo pequeño del tejido nervioso y se presiona ligeramente contra éste un portaobjetos que se ha dividido en tres regiones y del cual sólo se utilizarán las dos primeras para la elaboración de las improntas. Las impresiones deben ser muy delgadas, pues de lo contrario incrementa la fluorescencia inespecífica.

b) Fijación y tinción de las improntas.

1.- Sumergir los portaobjetos en una jarra de Coplin con acetona por un periodo mínimo de 1 hora (hasta 24 horas), pues esto permite que la muestra se adhiera fuertemente al portaobjetos, elimina grasas e incrementa la permeabilidad celular, lo que facilita que el conjugado penetre a las células y reaccione con el virus. Se recomienda que la acetona esté conservada a menos 20°C.

2.- Al término de la fijación se debe rodear las improntas con barniz u otro marcador. Esto evitará que el conjugado se extienda y se seque o se utilice mayor cantidad de éste (25-50 µl).

No omitir utilizar testigos tanto positivo como negativo en cada prueba.

3.- Descongelar dos alícuotas de conjugado (una absorbida con CVS y otra con SCN) y cubrir las impresiones con éstos.

4.- Colocar los portaobjetos en la cámara húmeda e incubar a 37°C por 30 minutos.

5.- Transcurrido el tiempo, lavar los portaobjetos con PBS dos veces, dejándolas sumergidas la segunda ocasión por 10 minutos, al término de los cuales se repite el enjuague pero con agua destilada.

6.- Permitir que se sequen las improntas, adicionar la glicerina fosfatada, colocar sobre ella un cubreobjetos y observar al microscopio de fluorescencia.

c) Observe primero el portaobjetos con el testigo positivo para identificar las características de la fluorescencia específica, después observe su control negativo para reconocer la presencia de fluorescencia inespecífica y por último sus muestras problema.

Interpretación de resultados.

La intensidad de la fluorescencia varía de negativo a 4+, siendo directamente proporcional a la cantidad de antígeno específico presente.

Las muestras que resulten negativas en esta prueba deberán examinarse nuevamente por medio de la inoculación en ratones lactantes o de 21 días de edad o en cultivos celulares de neuroblastoma (esta última prueba es más rápida ya que en 40 horas se obtiene el resultado).

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor al 95% si se sigue estrictamente el método descrito.

Bibliografía

1.- U.S. Department of Health and Human Services. 1981 Laboratory Methods for Detecting Rabies. Center for Disease Control.

2.- World Health Organization 1966. WHO Expert Committee on Rabies. Tech. Rep. Ser. No. 321 fifth report.

Título

Prueba biológica en ratones para la detección del virus de rabia.

Objetivo

Esta prueba se utiliza para determinar la presencia o ausencia del virus rábico.

Campo de aplicación

La prueba se realiza con muestras de tejidos provenientes de animales con neuropatías sugestivas de rabia.

Documentos conexos a consultarse.

1.- Manual de técnicas de diagnóstico virológico, F.A.O.

2.- NOM-011-SSA2-1993. Norma Oficial Mexicana para la prevención y control de la rabia.

Generalidades

Determinar la presencia del virus de la rabia a través de la signología que presentan los ratones lactantes o de 21 días inoculados con una suspensión de tejido nervioso o de glándulas salivales de animales sospechosos a rabia. A partir de muestras previamente analizadas por la técnica de inmunofluorescencia directa.

Equipo e instrumentos

1.- Centrífuga clínica o refrigerada.

2.- Jaulas para ratones.

3.- Refrigerador con congelador integrado.

4.- Ultracongelador y/o termo para nitrógeno líquido.

Materiales

1.- Agujas hipodérmicas calibre 27 por media pulgada.

2.- Algodón.

3.- Alimento para ratones.

4.- Jeringas de 0.25 ml, 0.5 ml y 1 ml.

5.- Mortero de porcelana con pistilo o mortero de Tembroek.

6.- Pinzas.

7.- Tijeras.

8.- Tubos de ensayo.

Reactivos

1.- Eter.

2.- Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH 7.6.

3.- Solución de antibióticos penicilina (100 000 U.I./ml) + estreptomina (100 000 U.I./ml).

Biológicos

1.- Suero fetal bovino libre de anticuerpos contra rabia o albúmina bovina fracción V.

2.- Animales de prueba.

3.- Ratones lactantes o de 21 días.

Condiciones ambientales

Temperatura óptima de 18 a 22°C en un lugar exclusivo para el alojamiento de los animales de prueba.

Preparación y acondicionamiento de la muestra.

Las muestras deben ser frescas, refrigeradas, congeladas o estar conservadas en una solución de glicerina al 50% en agua. Estas últimas deberán lavarse con PBS 3 veces con intervalos de 10 minutos.

Las muestras congeladas deben descongelarse previamente.

Procedimiento

1.- Se obtiene una muestra de 1 a 4 g del tejido a ser probado y se macera en un mortero estéril utilizando una cantidad suficiente de PBS adicionado con 0.75% de suero fetal bovino o albúmina bovina al 0.4% y antibióticos para una concentración final de 100 a 1000 U.I. de penicilina y de 100 a 1000 U.I. de estreptomycin por ml (dependiendo del grado de contaminación de las muestras procesadas) para obtener una suspensión de tejido al 10% que servirá de inóculo para los ratones.

2.- La suspensión al 10% se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, preferentemente en una centrífuga refrigerada a 4°C.

3.- Después de anestesiar a los ratones con éter y transcurridos al menos 30 minutos después de haber agregado antibióticos al inóculo, se inoculan 0.03 ml del mismo por vía intracerebral.

Fórmulas de cálculo.

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados

1.- El periodo de observación de los animales inoculados debe ser al menos de 28 días y la muerte de ratones en las primeras 72 horas deben considerarse inespecíficas.

2.- Se considera un diagnóstico positivo cuando los ratones presentan los signos nerviosos característicos de la rabia (tremores, incoordinación, ataxia, parálisis progresiva, postración y muerte). A partir del quinto día se puede sacrificar paulatinamente los animales y realizar la prueba de inmunofluorescencia directa, para abreviar el tiempo de duración de la prueba en virtud de que se puede observar fluorescencia específica en animales aparentemente sanos.

3.- El diagnóstico se considera negativo si los ratones sobreviven el periodo de observación de la prueba.

Indices de reproducibilidad y repetibilidad.

Mayor al 95% si se sigue estrictamente el método descrito.

Bibliografía

1.- U.S. Department of Health and Human Services. 1981 Laboratory Methods for Detecting Rabies. Center for Disease Control.

2.- World Health Organization 1966. WHO Expert Committee on Rabies. Tech. Rep. Ser. No. 321 fifth report.

Título

Prueba biológica en células de neuroblastoma para la detección del virus de rabia.

Objetivo

Esta prueba se utiliza para determinar la presencia o ausencia del virus rábico.

Campo de aplicación

La prueba se realiza en muestras de tejidos provenientes de animales con neuropatías sugestivas de rabia.

Documentos conexos a consultarse.

1.- Manual de técnicas de diagnóstico virológico, F.A.O.

2.- NOM-011-SSA2-1993. Norma Oficial Mexicana para la prevención y control de la rabia.

Generalidades

Determinar la presencia del virus de la rabia a través de cultivos de neuroblastoma infectados con una suspensión de tejido nervioso o de glándulas salivales de animales sospechosos a rabia, previamente analizados por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa

Equipo e instrumentos

1.- Centrífuga clínica o refrigerada.

2.- Estufa bacteriológica.

3.- Refrigerador con congelador integrado.

4.- Ultracongelador y/o termo para nitrógeno líquido.

Materiales

1.- Cubreobjetos.

2.- Jarras de Coplin.

3.- Mortero de porcelana con pistilo o mortero de Tembroek.

4.- Pinzas.

5.- Pipetas de 1 ml.

6.- Portaobjetos delimitados con teflón.

7.- Tijeras.

8.- Tubos de ensayo.

9.- Botellas de cultivo celular de 5 ml.

Reactivos

- 1.- Acetona a -20°C.
- 2.- Agua destilada estéril.
- 3.- Medio mínimo esencial para cultivo de tejidos.
- 4.- Solución de antibióticos penicilina (100 000 U.I./ml) + estreptomycin (100 000 U.I./ml).
- 5.- Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH 7.6.

#### Biológicos

- 1.- Cultivos de células de neuroblastoma con confluencia del 80%.
- 2.- Suero fetal bovino libre de anticuerpos contra rabia o albúmina bovina fracción V.

#### Condiciones ambientales

Temperatura óptima de 18 a 22°C en un lugar exclusivo para el diagnóstico de rabia.

Preparación y acondicionamiento de la muestra.

Las muestras deben ser frescas, refrigeradas o congeladas o estar conservadas en una solución de glicerina al 50% con agua. Estas últimas deberán lavarse con PBS 3 veces con intervalos de 10 minutos.

#### Procedimiento

1.- Se obtiene una muestra de 1 a 4 g del tejido a ser probado y se macera en un mortero estéril utilizando una cantidad suficiente de PBS adicionado con 0.75% de suero fetal bovino o albúmina bovina al 0.4% y antibióticos para una concentración final de 100 a 1000 U.I. de penicilina y de 100 a 1000 U.I. de estreptomycin por ml (dependiendo del grado de contaminación de las muestras procesadas) para obtener una suspensión de tejido al 10% que servirá de inóculo para las células.

2.- La suspensión al 10% se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, preferentemente en una centrífuga refrigerada a 4°C.

3.- Con 0.5 ml de este material se inoculan monoestrato celulares de neuroblastoma con una confluencia del 80% y se incuban durante 90 minutos a 37 grados centígrados.

4.- Al término de este tiempo se adiciona medio mínimo de cultivo con 2% de suero fetal bovino, para incubar a 37°C por 40 horas.

5.- Al finalizar este periodo se practica un raspado del monoestrato, se coloca en un tubo para centrífuga y se resuspenden las células obtenidas en PBS para centrifugar a 1500 rpm y posteriormente se desecha el sobrenadante. Este proceso se repite una vez más.

6.- Habiendo desechado el sobrenadante por segunda ocasión, se resuspenden las células en un volumen de 0.5 ml de PBS colocándolas en un portaobjetos y delimitando el área con teflón para permitir su secado. Se fija con acetona a -20°C durante 15 minutos, dejar secar y se realiza la prueba de inmunofluorescencia directa.

#### Fórmulas de cálculo.

En esta técnica no se utilizan.

#### Interpretación de resultados

Un diagnóstico positivo se obtiene al observar la fluorescencia específica en las células de neuroblastoma inoculadas.

El diagnóstico se considera negativo si no se observa la fluorescencia.

#### Bibliografía

- 1.- U.S. Department of Health and Human Services. 1981 Laboratory Methods for Detecting Rabies. Center for Disease Control.
- 2.- World Health Organization 1966. WHO Expert Committee on Rabies. Tech. Rep. Ser. No. 321 fifth report.
- 3.- Manual de técnicas de diagnóstico virológico, F.A.O.

### 13. Tuberculosis bovina

#### Título.

Diagnóstico histopatológico de la tuberculosis bovina.

#### Objetivo

Diagnóstico histológico diferencial de la Tuberculosis bovina en lesiones granulomatosas presentes en nódulos linfáticos y otros órganos en los bovinos.

#### Campo de aplicación

Identificación de las lesiones histológicas compatibles con tuberculosis, organismos alcohol-ácido resistentes, auramina o positivos reactivos durante el estudio postmortem.

Documentos conexos a consultarse.

Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).

**Generalidades**

Realizar el estudio histológico de las lesiones compatibles con tuberculosis y las pruebas confirmatorias mediante coloraciones de hematoxilina-eosina contratada, Ziehl Neelsen y/o nueva fucsina.

**Reactivos**

- 1.- Acido acético glacial concentrado.
- 2.- Agua destilada.
- 3.- Alcohol etílico 70%, 80%, 95% y 100% Xilol.
- 4.- Auramina-O.
- 5.- Azul de metileno bórax
- 6.- Bórax.
- 7.- Carbonato de litio.
- 8.- Cloruro férrico.
- 9.- Fenol.
- 10.- Formalina amortiguada al 10% pH 7.2.
- 11.- Naranja de acridina.
- 12.- Nueva fucsina.
- 13.- Parafina punto fusión 56°C.

**Materiales****Biológicos:**

Muestras de animales asegurados en la línea de inspección de carnes sospechosos y/o reactores a la prueba de la tuberculina. Nódulos linfáticos: traqueobronquiales, mediastínicos, medial retrofaríngeo, mandibulares, parotídeos, hepáticos y mesentéricos en algunos casos pulmón, hígado, bazo y riñón con presencia de lesiones sugestivas.

**Condiciones ambientales**

El corte de tejidos para el procesamiento se realizará, en la campana de humos, protegiéndose las manos con guantes de látex y ojos con los goggles, accionando la campana de extracción durante la preparación de los tejidos recibidos para procesamiento. Durante el procesamiento de tejidos se preferiría mantener el equipo de las campanas de extracción de vapores o alternativamente en un área amplia y ventilada.

**Preparación y acondicionamiento de la muestra**

Las condiciones de recepción de las muestras será recomendado el envío de los tejidos en un tamaño no mayor de 2 cm en una solución de formalina amortiguada al 10% pH 7.2, en una relación de tejido-formalina 1:10 con la identificación clara de las muestras con sus datos generales; órgano(s), nombre del propietario, ubicación de la explotación de origen, dónde se obtuvo la muestra, la descripción del animal (especie, raza, sexo, edad, etc.), identificación precisa del animal (arete, marcas u otros), así como el nombre, registro y domicilio del médico veterinario oficial o aprobado que remita la muestra.

Para el estudio histológico de rutina se contará con laminillas control positivo de tejidos con bacterias alcohol-ácido resistentes. Para las pruebas de Ziehl Neelsen y auramina o rodamina.

Las muestras serán ordenadas para su registro en los formatos de procesamiento de tejidos, posteriormente se extraen tejidos de los frascos y se colocan sobre toallas desechables para absorber la solución de formalina en la cual están embebidas. Cada tejido se examinará y cortará separadamente con un grosor de 2-5 mm seleccionándose áreas de tejido normal y anormal, reincorporándose nuevamente a los frascos originales de envío de tejidos. Posteriormente se colocan éstos en las cápsulas de procesamiento de tejidos identificadas previamente, cuando éstas hubieran estado calcificados se colocarán después de la formalina en las soluciones descalcificadoras antes del procesamiento de los tejidos\*.

**Procedimiento****Inclusión en parafina.**

- 1.- Formalina amortiguada 30 min.
- 2.- Alcohol etílico 70% 60 min.
- 3.- Alcohol etílico 80% 60 min.
- 4.- Alcohol etílico 95% 60 min.
- 5.- Alcohol etílico 95% 60 min.
- 6.- Alcohol etílico 100% 60 min.
- 7.- Alcohol etílico 100% 60 min.
- 8.- Alcohol etílico 100% 60 min.
- 9.- Xilol 60 min.

- 10.- Xilol 60 min.
- 11.- Xilol 60 min.
- 12.- Parafina 60 min. a 60°C.
- 13.- Parafina 60 min. a 60°C.
- 14.- Parafina 60 min. a 60°C.
- 15.- Inclusión de tejidos en parafina punto de fusión 56°C líquida.
- 16.- Corte de los tejidos a partir de los bloques de parafina en microtomo con un grosor de 4 a 6 micras.
- 17.- Montar el corte sobre la laminilla con el adhesivo, desparafinar en placa caliente u horno de microondas.
- 18.- Se tiñen las laminillas con los procedimientos indicados y se montan con resina sintética para su observación.

Tinciones

Tinción de hematoxilina-eosina contrastada.

Los tejidos procesados serán teñidos rutinariamente para la identificación de lesiones compatibles con tuberculosis bovina y diferenciar con otras entidades patológicas bajo el siguiente procedimiento:

1. Xilol 10 min.
2. Alcohol etílico 100% 5 min.
3. Alcohol etílico 96% 5 min.
4. Alcohol etílico 80% 5 min.
5. Alcohol etílico 70% 5 min.
6. Alcohol etílico 50% 5 min.
7. Lavar con agua corriente.
8. Hematoxilina 5 min. (hematoxilina de Harris).
9. Lavar con agua corriente.
10. Clarificar con alcohol ácido.
11. Lavar con agua corriente.
12. Virar con agua amoniacal o carbonato de litio.
13. Eosina 1 a 2 min.
14. Alcohol etílico 96% 5 min.
15. Alcohol etílico 96% 5 min.
16. Alcohol absoluto 5 min.
17. Alcohol-xileno 50% 5 min.
18. Xileno 10 min.
19. Xileno 15 min.

Tinción de nueva fucsina

De manera alternativa a la tinción de Ziehl Neelsen, este procedimiento puede favorecer la identificación de bacilos alcohol-ácido resistentes.

- 1.- Xilol 5 min.
- 2.- Xilol 5 min.
- 3.- Alcohol etílico 100% 1-2 min.
- 4.- Alcohol etílico 100% 2 min. y secar al aire.
- 5.- Lavar con agua destilada.
- 6.- Teñir con nueva fucsina 10 min.
- 7.- Colocar la laminilla individualmente en una solución saturada de cloruro de litio durante 30 seg.
- 8.- Diferenciar en alcohol acético cuando la laminilla sea decolorada.
- 9.- Lavar con agua tamponada corriente.
- 10.- Contrateñir con azul de metileno bórax.
- 11.- Alcohol etílico 95% 2 min.
- 12.- Alcohol etílico 100% 2 min.
- 13.- Clarificar en 2 cambios de xilol 2-3 min. cada uno.
- 14.- Montar con resina sintética

Tinción de Auramina o/y naranja de acridina para bacilos alcohol-ácido resistentes.

Se empleará como prueba confirmatoria en los casos sospechosos de tuberculosis bovina.

- 1.- Xilol 5 min.
- 2.- Xilol 5 min.
- 3.- Alcohol etílico 100% 1-2 min.

- 4.- Alcohol etílico 100% 2 min.
- 5.- Agua destilada 2 min.
- 6.- Auramina 10 min.
- 7.- Agua taponada corriente 1 min.
- 8.- Cloruro férrico 10% 10 min.
- 9.- Agua tamponada corriente 1 min.
- 10.- Naranja de acridina 2.5 min.
- 11.- Agua tamponada corriente 1 min.
- 12.- Alcohol etílico 70% 1 min.
- 13.- Alcohol etílico 95% 1 min.
- 14.- Alcohol etílico 100% 1 min.
- 15.- Xilol 5 min.
- 16.- Xilol 5 min.
- 17.- Cubrir la laminilla con resina.

Tinción de Ziehl Neelsen.

Se emplea como procedimiento de rutina para el diagnóstico confirmatorio de bacilos alcohol-ácido resistentes en muestras teñidas con hematoxilina y lesiones compatibles con tuberculosis bovina.

- 1.- Xileno 15 min.
- 2.- Xileno 15 min.
- 3.- Alcohol etílico 100% 5 min.
- 4.- Alcohol etílico 96% 5 min.
- 5.- Alcohol etílico 80% 5 min.
- 6.- Alcohol etílico 70% 5 min.
- 7.- Alcohol etílico 50% 5 min.
- 8.- Lavar con agua corriente.
- 9.- Carbol fucsina 30 min.
- 10.- Lavar con agua corriente.
- 11.- Decolorar con alcohol ácido.
- 12.- Lavar con agua corriente.
- 13.- Contrastar con azul de metileno 1 min.
- 14.- Lavar con agua corriente.
- 15.- Alcohol etílico 96% 5 min.
- 16.- Alcohol etílico 96% 5 min.
- 17.- Alcohol etílico 100% 5 min.
- 18.- Alcohol xileno (50/50) 5 min.
- 19.- Xileno 10 min.
- 20.- Xileno 15 min.

Interpretación de resultados.

- 1.- Hematoxilina-eosina.

Núcleos azules y citoplasma rosa, identificando el granuloma característico en tuberculosis bovina.

- 2.- Ziehl Neelsen.

Bacilos alcohol-ácido resistentes color rosa-rojizos, fondo azul tenue, eritrocitos color rojo.

- 3.- Nueva fucsina.

Bacilos alcohol-ácido resistentes color rojo, fondo color azul café.

- 4.- Auramina-O.

Fluorescencia positiva bacilos alcohol-ácido resistentes.

En la técnica de Hematoxilina-eosina contrastada pueden variar ligeramente los tiempos en ambos colorantes.

El tratamiento con sustancias descalcificantes puede afectar la tinción de bacilos alcohol-ácido resistentes en la tinción de nueva fucsina, los tiempos requeridos en las etapas de la tinción de Auramina-O y rodamina deberán ser exactos por lo que se hace necesario emplear controles positivos.

Bibliografía

MoTe F.R., Muhm, L.R. and Gigstad, C.D.: A staining method using acridine orange and auramine-O for fungi and mycobacteria in bovine tissue. *Stain technology*. 50: 59 (1975).

Mc Ilroy, G.S., Neill, D.S. and Mc Cracken, M.R. *Veterinary Record*. 118: 718-721 (1986).

Corner, L.A., Melville, L.K., Mc Cubbin, Small, K.J., Mc Cormick, B.S., Wood, R.P., and Rothel, S.I.: Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculosis lesions in cattle. *Australian Veterinary Journal*. 67: 389-392 (1993). Tuberculosis training for regulatory veterinarians. Animal and Plant Health Inspection Service. USDA, NVSL AMES IA (1993).

Título

Aislamiento de *Mycobacterium bovis*

Objetivo

Determinar bacteriológicamente la presencia de *Mycobacterium bovis* en muestras de origen animal.

Campo de aplicación

Esta prueba se realizará en muestras de tejidos u órganos de animales con lesiones sospechosas de ser tuberculosas o en nódulos linfáticos de animales positivos a las pruebas de tuberculina.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).

Generalidades

El estudio bacteriológico de la tuberculosis sirve para corroborar el diagnóstico realizado en el campo por medio de las pruebas tuberculínicas y para detectar animales con lesiones sospechosas de tuberculosis en los rastros o mataderos dentro de un programa de vigilancia epizootiológica.

Equipo e instrumentos

- 1.- Autoclave
- 2.- Bisturí y hojas de bisturí
- 3.- Campana de seguridad biológica tipo II o III con extracción de aire con velocidad promedio de 75 pies por minuto y filtración tipo HEPA
- 4.- Centrífuga de seguridad biológica con cubetas con tapón de rosca
- 5.- Congelador
- 6.- Estufa bacteriológica a 37°C
- 7.- Microscopio de campo claro
- 8.- Pinzas de ratón
- 9.- Pipeteador manual o automático
- 10.- Refrigerador
- 11.- Tijeras

La campana de seguridad biológica, la centrífuga y la incubadora deben estar en una sola área aislada delimitada del resto del laboratorio y que tenga señalamientos de riesgo biológico.

Materiales

- 1.- Arena estéril
- 2.- Charolas metálicas con y sin tapa
- 3.- Frascos color ámbar con gotero
- 4.- Matraces aforados
- 5.- Matraces Erlenmeyer
- 6.- Morteros de porcelana con mano
- 7.- Perlas de vidrio
- 8.- Pizetas
- 9.- Probetas
- 10.- Tubos de ensaye de 13 x 100
- 11.- Tubos de vidrio con tapón
- 12.- Vasos de precipitado

Equipo de seguridad

- 1.- Guantes de hule
- 2.- Lentes de protección
- 3.- Mascarillas protectoras con filtros HEPA

Medidas de bioseguridad

Las infecciones por el bacilo de la tuberculosis bovina son un riesgo comprobado para el personal de laboratorio especialmente para los individuos expuestos a los aerosoles infecciosos. Existen requisitos mínimos de bioseguridad para el personal que trabaja con micobacterias tuberculosas o bovinas.

**Personal**

- El personal de laboratorio debe ser tuberculino (PPD) positivo. De resultar negativo debe vacunarse con BCG y ser admitido en el área hasta que se verifique su positividad.

- Debe realizarse un control radiográfico de tórax del personal cada año y conservar las placas para estudios comparativos posteriores.

**Area de trabajo**

- Debe haber un área delimitada y aislada de las otras secciones del laboratorio donde se encuentre el equipo, se trabajen las muestras y se realicen cultivos y resiembras.

- La entrada al área debe ser restringida al momento de trabajar con muestras en la campana, centrifugar, revisar o realizar cultivos.

- El equipo de seguridad y prevención de accidentes debe estar disponible, ser suficiente para el personal del área y estar en un lugar visible junto con las instrucciones para su uso.

- Siempre debe contarse con propipetas o bombas para pipetear, evitando pipetear con la boca.

**Limpieza y desinfección**

- Todas las zonas de trabajo deben descontaminarse al menos una vez al día y siempre después de trabajar.

**Desecho de material contaminado**

- Antes de desecharlo, todo el material biológico contaminado debe ser esterilizado en autoclave.

- La cristalería y material utilizados en el procesamiento de muestras presumiblemente contaminados o material biológico como cultivos deben ser esterilizados antes de ser lavados.

**Reactivos**

- 1.- Acido clorhídrico
- 2.- Alcohol etílico de 96°
- 3.- Azul de metileno
- 4.- Fenol en cristales
- 5.- Fucsina básica
- 6.- Hidróxido de sodio
- 7.- Hipoclorito de sodio
- 8.- Medio de Lowenstein Jensen
- 9.- Medio de Stonebrink
- 10.- Rojo de fenol

**Material biológico**

Material sospechoso con lesiones granulomatosas: nódulos linfáticos o tejidos diversos, o nódulos linfáticos o tejidos de animales reactivos a la prueba de tuberculina en solución saturada de borato de sodio en una relación de tejido-volumen 1:1 o 1:2. Cuando no se cuente con medios disponibles para siembra inmediata, los órganos deberán ser retirados de la solución de borato y ser conservados en congelación a -20°C.

**Condiciones ambientales**

El procesamiento de las muestras se debe realizar bajo condiciones estrictas de seguridad biológica, en el interior de cabinas de seguridad microbiológica.

**Preparación y acondicionamiento de la muestra**

Seleccionar previamente la muestra: retirar toda la grasa y tejido conectivo de la muestra a procesar. Si la lesión es muy grande o tiene mucho exudado, elegir una parte externa de la lesión (cápsula) y parte del interior de la lesión. Cuando la muestra es muy pequeña, incluir toda. En caso de no haber lesiones visibles, seleccionar una porción de tejido representativo de la muestra.

**Procedimiento**

Descontaminación. La descontaminación de la muestra puede hacerse por el método de Petroff o por su variante ácido-álcali.

Método de Petroff.- Colocar la muestra en un mortero con arena y agua destilada, todo estéril y macerar. Trasvasar a un tubo con solución estéril de hidróxido de sodio al 4% en una proporción 1:2. Agitar vigorosamente e incubar a 37°C por 20 minutos, agitando cada 5 minutos.

Centrifugar por 20 minutos a 3,000 rpm y desechar el sobrenadante.

Agregar al sedimento 1 a 2 gotas de solución de rojo de fenol y unas gotas de una solución de ácido clorhídrico al 10% hasta que vire el indicador del rojo violáceo al amarillo anaranjado. Agregar 2 ml de agua destilada estéril y sembrar o bien agregar 3 ml de agua destilada estéril, agitar y centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos. Desechar el sobrenadante y sembrar el sedimento.

Variante ácido-álcali del método de Petroff.- Macerar en un mortero de porcelana agregando un poco de arena y agua destilada estériles. Trasvasar a dos tubos de ensaye estériles con tapón y guardar uno identificado en congelación.

Añadir al segundo tubo 5 partes de ácido clorhídrico al 10% y añadir 2 a 3 gotas de rojo de fenol al 1% hasta que vire a un color naranja. Agitar y dejar en reposo 20 minutos. Añadir gota a gota una solución de hidróxido de sodio 2 N agitando el tubo hasta que vire a un color violáceo (morado a lila).

Centrifugar a 3,000 rpm por 20 minutos y desechar el sobrenadante. Sembrar el sedimento.

#### Siembra

Sembrar el sedimento descontaminado con hisopo, pipeta Pasteur o asa bacteriológica, sobre la superficie de 1 tubo de medio Lowenstein Jensen y 2 tubos de medio de Stonebrink. Incubar a 37°C los tubos sembrados con los tapones flojos en posición horizontal el primer día y en posición vertical después del segundo día para que el sedimento seque sobre toda la superficie del medio. Revisar semanalmente durante 9 semanas. En caso de contaminación de todos los tubos, éstos se deben desechar y se debe procesar la muestra congelada (de réplica). Esta se divide en dos tubos. Se guarda uno en congelación y el otro se procesa para descontaminación y se debe efectuar nueva siembra como ya fue descrito.

Fórmulas de cálculo para resultados

No existen para este procedimiento.

Interpretación de resultados

Las colonias de *Mycobacterium bovis* se aprecian a simple vista a partir de la 3a. semana generalmente, pero pueden tardar hasta 9 semanas. Crecen mejor en el medio de Stonebrink (crecimiento eugónico o abundante) que en el medio de Lowenstein Jensen (crecimiento disgónico o pobre).

Morfología colonial

Medio de Lowenstein Jensen: colonias muy pequeñas (8.0 a 1.5 mm), translúcidas; con el tiempo toman una forma piramidal.

Medio de Stonebrink: colonias generalmente pequeñas, blancas, como pezones, que suelen estar dispersas.

Morfología celular

Bacilos largos; en el examen microscópico con tinción de Ziehl Neelsen se observan bacilos largos ácido alcohol resistentes (rojos) de 2 a 6 x 0.3 um, que pueden observarse como "cordones".

Todas las cepas aisladas sospechosas de ser *M. bovis* deben ser remitidas al Laboratorio de Referencia para realizar la identificación por pruebas enzimáticas.

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Es del 96% aproximadamente.

Bibliografía

Balandrano, C.S.; Anzaldo, F.G.; Peña F.G.P. y Betancourt M.X.: Tuberculosis. Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE-SAGAR.

A. Escobar G. Publicación No. 18 del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos; Secretaría de Salud; Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural; Organización Panamericana de la Salud. México, D.F., junio de 1996.

David, H.; Levy-Frebault, V. et Thorel, M.F.: Methodes de laboratoire pour mycobacteriologie clinique, Commission de Laboratoires de Référence et d'Expertise de l'Institut Pasteur; Institut Pasteur, París, 1989.

Kantor, I.N.: Bacteriología de la Tuberculosis Humana y Animal. Centro Panamericano de Zoonosis. Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de la Salud, Monografía Científica y Técnica No. II/Rev. 1, Martínez, Argentina, 1988.

#### **14. Enfermedad de Aujeszky**

Título

Sueroneutralización para detección de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky (EA).

Objetivo

Esta prueba se utiliza para cuantificar los anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky, en muestras de suero sanguíneo de porcinos que han estado en contacto con el virus.

Campo de aplicación

Esta prueba se utiliza para confirmar o descartar la presencia de anticuerpos en animales vacunados, sospechosos o con signos clínicos de EA.

Documentos conexos a consultarse.

Norma Oficial Mexicana NOM-007-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky.

Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria.

#### Generalidades

Determinar la presencia de anticuerpos específicos contra el virus de la EA, capaces de neutralizar la acción infectante del virus de la EA a una concentración de 200 DICC 50%.

#### Equipo e instrumentos

- 1.- Agitador de microplacas.
- 2.- Baño María.
- 3.- Centrífuga clínica.
- 4.- Estufa de CO<sub>2</sub>.
- 5.- Microscopio de luz invertida.
- 6.- Multipipetas de 8 a 12 canales (50-200 microlitros).
- 7.- Micropipetas de 50-100 microlitros.
- 8.- Ultracongelador o termo con nitrógeno líquido
- 9.- Refrigerador con capacidad mínima de 9 pies cúbicos, con congelador integrado.

#### Materiales

- 1.- Gradillas.
- 2.- Microplacas de 96 pozos con fondo plano.
- 3.- Puntas para pipetas.
- 4.- Tubos de ensayo.

#### Reactivos

- 1.- Antibiótico (penicilina, estreptomycin o kanamicina al 1%).
- 2.- Bicarbonato de sodio en solución al 7%.
- 3.- L.E. (Earles con lactoalbúmina).

#### Biológicos

1.- Células PK15 (riñón de cerdo), SKL (línea de riñón de cerdo) o cualquier otra línea o cultivo al cual esté adaptado el virus. Células en suspensión, pero se puede trabajar en monoestrato.

2.- Suero Fetal Bovino.

3.- Suero de porcino, testigo negativo.

4.- Suero de porcino testigo positivo.

5.- Virus de la Enfermedad de Aujeszky con título mínimo de 105 DICC 50%/ml, el cual se debe conservar en congelación a -70°C o en nitrógeno líquido.

#### Condiciones ambientales

De laboratorio con temperatura óptima de 18 a 25°C.

#### Preparación y acondicionamiento de la muestra

- Centrifugar la muestra de suero a 1,500 rpm x 10 minutos.

- Transferir el suero a un tubo de ensayo e identificar.

- Inactivar a 56°C durante 30 minutos en Baño María.

- En caso de que la prueba se lleve a cabo el día siguiente de preparada la muestra, esta última debe conservarse en congelación.

#### Procedimiento

En los dos primeros pozos de cada columna de una microplaca, depositar 50 microlitros del suero problema. Las cantidades (50 microlitros) pueden variar y se pueden utilizar 25 microlitros.

- Agregar a todos los pozos de la microplaca, 50 microlitros de medio diluyente (L.E.+1% de bicarbonato de sodio).

- Hacer diluciones dobles a partir del 2o. pozo, quedando el primer pozo como control de suero, para detectar si éste presenta toxicidad o alguna otra característica, que pueda interferir con la prueba.

- Agregar 50 microlitros de virus de E.A. ajustado a 200 DICC 50% (dosis infectantes de cultivo celular 50%) a cada pozo, excepto a los controles de suero.

- Incubar durante 1 hora a 37 °C.

- Añadir 100 microlitros de células PK15 o equivalente y dejar en incubación de 48 a 72 horas, revisando diariamente los controles.

Para el control de los biológicos utilizados, preparar en forma paralela otra microplaca con lo siguiente:

- Virus origen "O" o virus de trabajo, a partir del cual se harán 3 diluciones logarítmicas. Las que irán en las hileras correspondientes a:

- Control de células: Depositar en las hileras 11 y 12 de la microplaca, 100 microlitros de células PK15 o equivalente por pozo, para detectar posibles alteraciones en las mismas.

- Control de virus: El virus se ajusta de acuerdo al título a 200 DICC 50%, a partir de lo cual efectuar tres diluciones logarítmicas para asegurar que hay 200 dosis.

1 y 2: Virus de origen.

3 y 4: 10-1

5 y 6: 10-2

7 y 8: 10-3

- Control positivo: Utilizar un suero testigo positivo, con título conocido de anticuerpos contra E.A. Colocar en la hilera número 9 de la microplaca.

- Control negativo: Emplear un suero testigo negativo a anticuerpos contra la E.A. y depositarlo en la hilera número 10 de la microplaca.

Fórmulas de cálculo para resultados

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados

1.- Control de células.- Observar que el monoestrato esté completo y que las células presenten una morfología característica.

2.- Control positivo.- Observar que el monoestrato celular se encuentre completo, en virtud de que el suero testigo positivo neutralizó al virus y evitó el efecto citopático.

3.- Control negativo.- Observar el efecto citopático producido por el virus, al no existir anticuerpos en el suero testigo negativo.

La lectura se puede hacer más evidente, eliminando el medio diluyente y añadiendo algún colorante vital, como el azul de metileno, que tiñe únicamente a las células vivas.

Los resultados de esta prueba se expresan en forma cuantitativa, con base al título o cantidad de anticuerpos neutralizantes que estén presentes en el suero problema.

Por lo tanto, los títulos serán cuantificados, a partir del primer pozo en el que se observe claramente efecto citopático.

Es decir, si el efecto citopático se observó en el pozo con dilución de 1:32, el título será expresado como 1:16, ya que en la siguiente dilución no neutralizaron el virus, por lo que este último provocó muerte celular.

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor a un 95% si se sigue literalmente el método descrito.

Bibliografía

Office International des Epizooties (OIE): Manual of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements for Biological Products for Lists A and B. Diseases. Vol. II 1990 (A/013).

Veterinary Virology. Sashi B. Mohanty, Sukanta K. Dutta; Edit. Lea Febiger. Philadelphia 1981.

Virología Práctica. Charles H. Cunningham. Edit. Acribia Zaragoza 1959. pp. 71-80.

Título

Aglutinación látex para la detección de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky (EA).

Objetivo

Detectar anticuerpos específicos contra el virus de la EA, utilizando un método de aglutinación visible a simple vista.

Campo de aplicación

Esta prueba se utiliza para confirmar o descartar la presencia de anticuerpos en animales vacunados, sospechosos o con signos clínicos de EA. La prueba está estandarizada de forma cualitativa, usando suero o plasma porcino.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-007-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky.

Generalidades

Después de la infección con el virus de pseudorrabia, el huésped desarrolla una respuesta inmune contra el virión, primero aparecen las Inmunoglobulinas (Ig) M e inmediatamente después las IgG. Las IgM declinan rápidamente, mientras las IgG se mantienen de por vida en el huésped.

La prueba de aglutinación en látex provee un método rápido para detectar las IgM o contra el virus de la EA en suero o en el plasma.

El reactivo es una suspensión de partículas de látex que han sido sensibilizadas con antígenos preparados con virus de EA parcialmente purificado.

Cuando el látex es mezclado por rotación sobre una placa de cristal con suero que contiene anticuerpos contra el virus de la EA, el látex aglutina.

La presencia de anticuerpos es indicativa de que el animal en cuestión, en algún periodo de su vida estuvo en contacto con virus de campo de la EA o fue vacunado.

Equipo e instrumentos

- 1.- Agitador (Vórtex).
- 2.- Micropipetas de 50-100 microlitros.
- 3.- Refrigerador con capacidad mínima de 9 pies cúbicos, con congelador integrado.

Materiales

Vienen incluidos en el Kit.

Reactivos

Vienen incluidos en el Kit.

Condiciones ambientales

De laboratorio con temperatura óptima de 18 a 25°C.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

La muestra puede utilizarse en su forma original o puede inactivarse a 56°C durante 30 minutos en Baño María.

En caso de que la prueba se lleve a cabo el día siguiente de preparada la muestra, esta última debe conservarse en congelación.

Los sueros hemolizados parecen no afectar la sensibilidad y especificidad de la prueba.

Los sueros contaminados no deben procesarse.

Procedimiento

- a.- Los reactivos deben estar a temperatura ambiente de 21°C a 25°C.
- b.- Marcar e identificar cada muestra que se va a probar.
- c.- Agregar con una pipeta (micropipeta), 150 microlitros de la solución de dilución.
- d.- Agregar 50 microlitros de suero a cada tubo que contiene buffer de dilución para que quede una dilución 1:4 y mezclar varias veces. Con la misma punta transferir 50 microlitros de la muestra diluida a la placa de vidrio de 1.4 cms.
- e.- Dispersar las muestras que van a ser examinadas con un agitador (usar uno por muestra).
- f.- Mezclar el reactivo de látex en el vórtex (agitador) por unos cuantos segundos o en forma manual invirtiéndolo varias veces.

Colocar la botella del reactivo del látex en una posición vertical y perpendicular a la placa para que la gota del látex sensibilizado caiga libremente sobre cada pozo de la placa que contiene el suero diluido. Evitar que la gota sea muy grande.

Colocar la placa sobre un rotor de cubierta húmeda y girar de 80 a 120 rpm, formando círculos de aproximadamente 2 cm de diámetro o mezclar la muestra girando la placa de vidrio en forma manual por 5 minutos; girando en forma inclinada lentamente (aproximadamente 20 a 25 veces por minuto) durante 5 minutos.

Inactivación por calor:

Muestra no diluida, en Baño María a 56°C (+2) por 30-33 minutos.

Interpretación

La placa deberá leerse en estado húmedo e inmediatamente examinarla bajo luz incandescente o bajo la luz del sol para observar partículas agregadas de látex que son similares a las observadas en el suero control positivo.

Mover suavemente la placa para que se facilite la visualización de las reacciones positivas débiles.

La aglutinación en látex indica la presencia de anticuerpos y debe reportarse como positiva.

Los sueros negativos no producen aglutinación y el látex se mantiene terso.

La presencia de anticuerpos es indicativo de infección o de vacunación con el virus de la EA.

Todas las muestras positivas 1:4 se deben probar de acuerdo al siguiente protocolo:

Las muestras positivas deben ser probadas con dilución 1:40, esto se hace mezclando 50 microlitros de la solución original 1:4 y 400 microlitros (0.45 ml.) de la solución de dilución (1-9 partes).

Las muestras de suero que son positivas a ambas diluciones deben ser consideradas positivas.

Las muestras que son positivas 1:4 pero negativas a 1:40 se deben inactivar y repetirse.

Probar el suero con la dilución 1:4 como se indica.

Si el suero se mantiene positivo en la dilución 1:4 es positivo y se debe confirmar con otra prueba.

#### Bibliografía

Veterinary Virology. Sashi B. Mohanty, Sukanta K. Dutta; Edit. Lea Febiger. Philadelphia 1981.

Virología Práctica. Charles H. Cunningham. Edit. Acirbia Zaragoza 1959. pp. 71-80.

#### Título

Prueba de Inmunoperoxidasa para detección de anticuerpos séricos contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky (E.A.).

#### Objetivo

Detectar anticuerpos contra la EA por la técnica Inmunoenzimática-peroxidasa directa.

#### Campo de aplicación

Esta prueba se utiliza como prueba tamiz para la detección de animales o piaras seropositivas, como apoyo a la Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky.

#### Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-007-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky.

Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria.

#### Generalidades

Está basada en los principios de la prueba de ELISA en monoestrato de líneas celulares sensibilizadas con el virus de EA, las muestras de suero que tengan anticuerpos específicos contra éste, efectuarán la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y una proteína conjugada con peroxidasa (proteína g conjugada), se fija a la porción fc de los anticuerpos permitiendo la reacción enzimática al agregar el sustrato; la peroxidasa activa al indicador, coloreando específicamente el citoplasma de las células.

#### Equipo e instrumentos

- 1.- Estufa bacteriológica con rango de temperatura de 22°C a 40°C.
- 2.- Micropipeta uni o multicanales de 1 a 50 y de 50 a 250 microlitros
- 3.- Microscopio de luz invertida

#### Materiales

- 1.- Frascos de vidrio de 10, 50, 100 y 500 ml.
- 2.- Marcadores con tinta indeleble
- 3.- Microplacas de 96 pozos de fondo en "U" o fondo plano
- 4.- Pipetas de 1, 5, 10 y 20 ml.
- 5.- Puntas para micropipeta
- 6.- Recipiente con tapa para incubación de microplacas (cámara húmeda)
- 7.- Toallas absorbentes de papel

#### Reactivos:\*

- 1.- Indicador (3-amino-9-etil-carbazol)
- 2.- Microplacas con monoestrato de células PK15 u otra línea celular con características similares, sensibilizadas con el virus de la E.A.
- 3.- Proteína G conjugada con peroxidasa
- 4.- Solución A: fosfato de sodio al 0.5 M  
Solución B: Acido cítrico al 0.1 M
- 5.- Solución de dilución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.
- 6.- Solución de lavado
- 7.- Suero testigo negativo
- 8.- Suero testigo positivo
- 9.- Sustrato.

#### Condiciones ambientales

De laboratorio con temperatura óptima de 18 a 25°C.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Sueros para estudio conservados en refrigeración o congelación, sin inactivar.

Procedimiento

Preparación de los reactivos de acuerdo al instructivo de los equipos (kit's) de peroxidasa elaborados por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios.

- Realizar diluciones de los sueros problema y de los testigos positivos y negativos 1:10 (20 microlitros de suero y 180 microlitros de solución de dilución).

- Descongelar una microplaca sensibilizada durante 5 min. a medio ambiente y lavar en tres tiempos con solución de lavado.

- Secar bien las microplacas con toallas absorbentes y adicionar 50 microlitros por pozo (3 pozos; 1 testigo negativo y 2 infectados) de los sueros problema previamente diluidos 1:10, así como de los sueros testigo positivo y negativo.

- Incubar la microplaca a 37°C por 30 min. en cámara húmeda.

- Retirar de la incubación las microplacas y decantar los sueros, lavar en tres tiempos con solución de lavado.

- Secar las microplacas con toalla absorbente y adicionar 50 microlitros de proteína G conjugada, diluida 1:500 en solución de dilución.

- Incubar a 37°C por 30 min. en cámara húmeda.

- Retirar de la incubación las microplacas, decantar la proteína y lavar en tres tiempos con solución de lavado.

- Secar las microplacas con papel absorbente y adicionar 50 microlitros del indicador diluido en la solución A y B más el sustrato, el indicador debe ser preparado en el momento que se va a adicionar.

- Tapar las microplacas e incubar a temperatura ambiente por 20 min.

- Realizar las lecturas en el microscopio de luz invertida.

Fórmulas de cálculo para resultados

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados

Se considera reacción positiva cuando 2 de los pozos que contienen células infectadas, muestran por lo menos una colonia de células teñidas de color café-rojizo en su citoplasma y el núcleo permanece sin tinción.

Se considera reacción sospechosa si uno de los pozos infectados manifiesta células teñidas, debiendo realizar nuevamente la prueba.

Se considera reacción inespecífica cuando en el pozo que contiene células no infectadas se observan células teñidas y tendrá que repetirse, haciendo más diluciones del suero 1:20 y 1:40 o realizar la prueba de ELISA y/o sueroneutralización.

Se considera reacción negativa, en el caso de que los 2 pozos que contienen células infectadas no muestren coloración.

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor a 95% si se sigue literalmente el método descrito.

Bibliografía

Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, OIE. París, Francia 1992.

Título

Prueba de Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), para detección de anticuerpos contra la Enfermedad de Aujeszky EA (tamiz "screening").

Objetivo

Detectar anticuerpos contra la Enfermedad de Aujeszky por la técnica de inmunoensayo, que es una prueba rápida y confiable.

Campo de aplicación

Esta prueba se utiliza como prueba tamiz para la detección de animales o piaras seropositivas, como apoyo a la Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-007-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky.

Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria.

Generalidades

La prueba está basada en una reacción inmunoenzimática que se efectúa en placas sensibilizadas con antígeno purificado.

Equipo e instrumentos

- 1.- Lector ELISA
- 2.- Micropipeta
- 3.- Impresora
- 4.- Estufa bacteriológica a 32°C, con humedad
- 5.- Refrigerador con capacidad mínima de 9 pies cúbicos, con congelador integrado

Materiales

- 1.- Frascos de 50 y 100 ml.
- 2.- Frascos de vidrio de 500 ml. con tapón de rosca
- 3.- Vaso de precipitado de 500 ml.
- 4.- Recipientes contenedores de soluciones
- 5.- Puntas de plástico para micro y multipipetas

Reactivos:

La mayoría de estos reactivos vienen incluidos en el kit.

- 1.- Concentrado de ABTS
- 2.- Conjugado antiporcino con gentamicina como conservantes
- 3.- Control negativo porcino
- 4.- Control positivo débil
- 5.- Control positivo fuerte
- 6.- Diluyente para ABTS
- 7.- Placas absorbida con virus EA
- 8.- Solución de lavado 10X
- 9.- Solución preparada de ácido fluorhídrico diluido

Condiciones ambientales

De laboratorio con temperatura óptima de 18 a 25°C.

Procedimiento

Debido a las diferentes metodologías descritas por los diversos fabricantes, se deberán seguir estrictamente las mismas, así como las recomendaciones anexas en el equipo.

A continuación se describe la técnica utilizada por IDEXX (Herd chek).

Vertir 100 microlitros del control negativo no diluido en los pozos A1, A2 y A3.

Vertir 100 microlitros del control positivo débil no diluido en los pozos A4, A5, A6.

Vertir 100 microlitros de control positivo fuerte no diluido en los pozos A7 y A8.

1. La muestra problema diluida 1:20 en los pozos correspondientes. (Todas las muestras se deben de trabajar por duplicado).

2. Se incuba 30' a temperatura ambiente.

3. Se vacía el líquido.

4. Se lava de 3 a 5 veces con 300 microlitros de solución de lavado, sacudir firmemente sobre un papel absorbente.

5. Poner 50 microlitros de conjugado a cada pozo.

6. Incubar 30' a temperatura ambiente y preparar la solución ABTS en este momento.

7. Repetir paso número 6.

8. Poner 100 microlitros de la solución de sustrato ABTS en cada pozo de las placas de la prueba.

9. Incubar 20' a temperatura ambiente.

10. Vertir 50 microlitros de solución detenedora en cada pozo de la placa de prueba para detener la reacción y en los pozos de la placa en blanco que contiene el sustrato.

11. Calibrar el lector con placa no absorbida y leer a 410 nm.

Fórmula para cálculo de resultados

1. Cálculo del Promedio del Control negativo (NC7)

$$NC = \frac{A_1 A(410) + A_2 A(410) + A_3 A(410)}{3}$$

2. Cálculo del promedio del control positivo débil (WPCZ)

$$\frac{WPC \times A4 + A(410) + A5A(410) + A6A(410)}{3}$$

3. Cálculo del promedio del control positivo fuerte (SPCx)

$$SPC x = \frac{A7 + A(410) + A8(410)}{2}$$

4. Cálculo del cociente s/p

$$s/p = \frac{(A(410) \text{ muestra} - (NCx))}{(WPCx) - (NCx)}$$

**Interpretación de resultados**

1. Si el cociente s/p es menor que 0.4 la muestra se considera negativa.
2. Si el cociente s/p es mayor o igual que 0.4 la muestra se clasifica como Positiva.

**Bibliografía**

Office International des Epizooties (DIE): Manual of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements for Biological Products for Lists a and B. Diseases. Vol. II 1990 (A/013).

Veterinary Virology. Sashi B. Mohanty, Sukanta K. Dutta; Edit. Lea Febiger. Philadelphia 1981.

Virología Práctica. Charles H. Cunningham. Edit. Acribia Zaragoza 1959. pp. 71-80.

**Título**

Prueba de Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), para detección de anticuerpos contra la glicoproteína I del virus de la Enfermedad de Aujeszky (EA gpI).

**Objetivo**

Detectar anticuerpos en muestras de suero de porcinos, contra la glicoproteína I del virus de la Enfermedad de Aujeszky, los cuales en caso de ser detectados sólo son producidos cuando:

- a) Los cerdos han estado en contacto con virus de campo de la EA.
- b) Los cerdos fueron vacunados con vacunas elaboradas con virus completo de la EA.

**Campo de aplicación**

Esta prueba se utiliza para la detección de animales o piaras seropositivas al virus de la EA, como apoyo a la Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky.

**Documentos conexos a consultarse**

Norma Oficial Mexicana NOM-007-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky.

Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria.

**Generalidades**

La prueba está basada en una reacción inmunoenzimática que se efectúa en placas sensibilizadas con antígeno purificado. Durante la primera incubación, los anticuerpos anti EA presentes en el suero, incluyendo aquellos producidos contra gpI reaccionan con el antígeno en el plástico. Después de un lavado, se añade el conjugado de anticuerpos monoclonales anti gpI a la placa, donde puede unirse a cualquier antígeno gpI durante una segunda incubación. Si no hay anticuerpos anti gpI en el suero problema, el antígeno gpI no ocupado está disponible para los anticuerpos conjugados. Por el contrario, si hay anticuerpos anti gpI en el suero, los anticuerpos monoclonales conjugados con la enzima, no pueden reaccionar con el antígeno.

Después de este periodo de incubación el conjugado que no ha reaccionado se elimina por lavado y se añade una solución sustrato-cromógeno. En presencia de la enzima, el sustrato se convierte en un producto que reacciona con el cromógeno generando un color azul.

**Equipo e instrumentos**

1. Estufa bacteriológica de 37°C, con humedad
2. Impresora
3. Lector para placas de ELISA
4. Micropipeta de un solo canal 5-100 µl.
5. Micropipetas de 8 a 12 canales con capacidad de 50 a 300 µl.
6. Pipetas serológicas de 1,5 y 10 ml.
7. Potenciómetro
8. Probetas graduadas, de 500 ml.

9. Refrigerador con capacidad mínima de 9 pies cúbicos, con congelador integrado

**Materiales**

1. Frasco de vidrio de 50 y 100 ml.
2. Frascos de vidrio de 500 ml. con tapón de rosca
3. Microplacas de 96 pozos con antígeno de EA adherido a la superficie
4. Microplacas para cultivo celular de 96 pozos de fondo plano
5. Puntas de plástico para micropipeta de 300 µl. de capacidad
6. Recipientes contenedores de soluciones.
7. Vaso de precipitado de 500 ml.

**Reactivos:**

La mayoría de estos reactivos vienen incluidos en el Kit.

**Conjugado anti EA gpI**

1. Suero control negativo al virus de la EA
2. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2.
3. Suero control positivo al virus de la EA
4. Tetra-metil-benzidine (TMB) y su diluyente

**Condiciones ambientales**

Temperatura de laboratorio (18-26°C), evitar corrientes de aire acondicionado o de calefacción, no trabajar bajo la luz directa del sol.

**Preparación y acondicionamiento de la muestra**

Diluir las muestras en base 2 (1:2) en diluyente para las muestras.

**Procedimiento**

Debido a las diferentes metodologías descritas por los diversos fabricantes, se deberán seguir estrictamente las mismas, así como las recomendaciones anexas en el equipo.

A continuación se describe la técnica utilizada por IDEXX: HerdChek Anti ADV gpI.

Vertir 100 µl del control negativo no diluido en los pozos A1, A2 y A3.

Vertir 100 µl del control positivo no diluido en los pozos A4 y A5.

Vertir 100 µl de muestra diluida, en los pozos apropiados.

Incubar 60' a temperatura ambiente 18-23 °C)

Lavar de 3 a 5 veces con 300 µl de solución de lavado, sacudir suave pero firmemente sobre un papel absorbente.

Poner 100 µl de conjugado anti ADV gpI en cada pozo.

Incubar 20' a temperatura ambiente y preparar la solución TMB en este momento.

Repetir el paso de lavado.

Poner 100 µl de la solución de sustrato TMB en cada pozo de las placas de la prueba.

Incubar 15' a temperatura ambiente.

Vertir 50 µl de solución detenedora en cada pozo de la placa de prueba para detener la reacción.

Calibrar el lector de ELISA con aire y leer a 650 nm.

**Fórmula para cálculo de resultados**

1. Cálculo del Promedio del Control negativo (NCx)

$$\frac{A1 A(650) + A2 A(650) + A3 A(650)}{3}$$

2. Cálculo del promedio del control positivo (PCx):

$$\frac{A4 A(650) + A5 A(650)}{2}$$

3. Cálculo de inhibición %:

$$\frac{NCx - muestra A(650) \times 100}{NCx}$$

**Interpretación de resultados**

Presencia de COLOR (AZUL) en el pozo

Lo anterior se debe a que los epitopes g1 del virus de la E.A. fueron ocupados por los anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína 1, los cuales al reaccionar con el cromógeno revelan el color azul.

Los epitopes g1 se encontraban libres debido a que los anticuerpos presentes en la muestra son contra glicoproteínas diferentes a la g1.

En este caso, el valor S/N es igual o mayor de 0.7.

Es decir, las muestras de suero corresponden a CERDOS VACUNADOS CON VACUNA g1 NEGATIVA.

Ausencia de color en el pozo.

Significa que se encuentran anticuerpos contra todo tipo de epitopes del virus de la E.A., incluyendo a la g1. Es decir el cerdo fue vacunado con VACUNA DE VIRUS COMPLETO o tuvo contacto con VIRUS DE CAMPO.

(capaces de reaccionar contra la glicoproteína 1).

Lo anterior se debe a que los epitopes g1 del virus de la E.A. NO fueron ocupados por los anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína 1, los cuales son desechados en el proceso de lavado y por lo tanto NO hay sustrato para el cromógeno.

En este caso el valor S/N es igual o menor a 0.6.

1. Si el cociente s/p es menor que 0.4 la muestra se considera negativa.

2. Si el cociente s/p es mayor o igual que 0.4 la muestra se clasifica como Positiva.

**Bibliografía**

Office International des Epizooties (OIE): Manual of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements for Biological Products for Lists A and B. Diseases. Vol. II 1990 (A/013).

Gustafson, D.P. 1984. Pseudorabies, P. 209-223 in Leman, A. D., Glock, R.D., Mengeling, W. L., Penny, R. H., et al. Diseases of Swine, 5th Edition. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A.

### **15. Fiebre porcina clásica**

**Título**

Aislamiento del Virus de Fiebre Porcina Clásica (FPC) en microplacas, evidenciado por inmunoperoxidasa.

**Objetivo**

Aislar el virus de casos clínicos de FPC y evidenciar el antígeno por técnicas inmunoenzimáticas (inmunoperoxidasa).

**Campo de aplicación**

En la confirmación del diagnóstico de FPC como apoyo a la Campaña Nacional contra la FPC.

**Documentos a consultarse**

Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica.

**Generalidades**

La prueba se utiliza para aislar el agente etiológico de la FPC, a partir de muestras remitidas para su diagnóstico por Inmunofluorescencia: tonsila, bazo, ganglio y riñón, los cuales se maceran, filtran e inoculan en monoestratos de líneas celulares de riñón de cerdo (PK15), de testículo de cerdo (ST) ya que éstas son susceptibles a la replicación del virus de FPC.

**Equipos e instrumentos**

1. Autoclave escala de 1.5 kg de presión a 121°C.
2. Balanza con escala de 0.001 g a 10 g, mínimo
3. Centrífuga refrigerada escala de 0 a 5000 rpm y de 0°C a -25°C.
4. Congelador con escala de temperatura de 0°C a -30°C.
5. Estufa bacteriológica con suministro de CO<sub>2</sub>, rango de temperatura de 22°C a 40°C.
6. Microscopio óptico, con objetivos seco débil, seco fuerte e inmersión
7. Microscopio invertido, objetivos: panorámico, seco débil y seco fuerte
8. Refrigerador con capacidad mínima de 9 pies cúbicos con congelador integrado
9. Ultracongelador (Revco) con escala de 0°C a -70°C.

**Materiales**

1. Botellas para cultivos celulares de 5 a 15 ml.
2. Cajas de Petri
3. Filtros con membrana de .45 y .22 micrómetros de diámetro
4. Marcadores de tinta indeleble
5. Microplacas de plástico, con 96 pozo, fondo plano
6. Mortero de porcelana con pistilo y mortero de Stenbrook
7. Multipipetas con 8 o 12 canales

8. Pinzas y tijeras
9. Pipetas de 5, 10 y 20 ml.
10. Probetas de 100 ml.
11. Puntas para multipipeta
12. Tubos de centrifuga

Reactivos

1. Amino -9-etilcarbazol (cromógeno)
2. Acetona al 30%
3. Albúmina sérica bovina al .02%
4. Antibióticos en polvo (penicilina/estreptomina)
5. Bicarbonato de sodio en solución al 7%
6. Conjugado para inmunoperoxidasa (proteína G+peroxidasa)
7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (sustrato)
8. Medio mínimo esencial (MEM) completo
9. Solución amortiguadora de fosfato SAF, pH 7.2
10. Solución de fosfatos .01 M + tween 20 (SAF-L)
11. Solución de fosfatos .01 M + NaCl 2.1% + Tween 20 al 0.5% (SAF-D)
12. Soluciones A y B

Biológicos

1. Líneas celulares de riñón de cerdo (PK15) y de testículo de cerdo (ST)
2. Suero de cerdo, hiperinmune contra el virus de la FPC
3. Suero Fetal Bovino, libre de virus y anticuerpos contra el virus de la Diarrea Viral bovina
4. Virus de FPC

Condiciones ambientales

De laboratorio, con temperatura óptima de 18-26°C en área estéril.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

La tonsila, ganglios submaxilares y bazo son los órganos de elección.

Deben conservarse en refrigeración y/o congelación en frascos o bolsas estériles con cierre hermético.

Procedimiento

Cortar 1 a 2 g. de muestra, pasar a cajas de Petri y lavar 2 veces con PBS con antibiótico al 2%. Posteriormente macerar en un mortero, agregando PBS o solución de EARLE estéril, hasta obtener una pasta homogénea (dilución 1:10)

Pasar a un mortero Stenbrook para un segundo macerado.

Depositar la suspensión del macerado en tubos de centrifuga.

Centrifugar a 5000 rpm durante 15 minutos a temperatura de 5°C.

Cosechar el sobrenadante y filtrar.

Inocular 100 microlitros del fluido centrifugado a las microplacas, dejando los pozos de las columnas 11 y 12, sin infectar como controles de células.

Inocular en la línea H de la microplaca el virus control positivo.

El fluido del macerado debe inocularse a una botella de cultivo, dejando una botella como control celular.

Incubar las microplacas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 48 o 72 horas.

El fluido de las microplacas se retira y se lavan con PBS, se secan y se fijan con acetona al 30% con albúmina sérica al .02% durante 10 a 15 minutos, secándolas posteriormente.

La botella se incuba 1 hora a 37°C y posteriormente se retira el inóculo, se lava con PBS y se adiciona MEM, incubando 48 o 72 horas.

Las botellas inoculadas se congelan a -70°C y después, se descongelan rápidamente.

El fluido se recolecta en tubos de centrifuga y se centrifuga a 3000 - 5000 rpm/15-20 minutos.

Cosechar el sobrenadante, prosiguiendo con los puntos 5 y 9.

Filtrar. Inocular a microplacas. Inocular en la línea H de la microplaca el virus control positivo. Incubar.

Una vez secas las microplacas, preparar el suero hiperinmune de FPC en una dilución 1:10 y depositar 50 microlitros en cada pozo e incubar 15-20 minutos a 37°C.

Retirar el suero hiperinmune y lavar las microplacas con (SAF L) 2-3 veces.

Adicionar el conjugado a una dilución 1:500, depositando 50 ml a cada pozo de las placas e incubar con las mismas condiciones del punto anterior.

Retirar conjugado y lavar con SAF-L 2-3 veces.

Adicionar el sustrato cromógeno, 50 ml/pozo, e incubar a medio ambiente 15-20 minutos.

Retirar sustrato y lavar las placas con SAF-L 2 a 3 veces.

Secar y observar al microscopio invertido o microscopio óptico.

Interpretación de resultados

Cuando se observa tinción rojo ladrillo en el citoplasma y membrana de la línea celular, el resultado se considera positivo, tal como se observa en el control positivo.

Indices de reproductibilidad y repetibilidad

Mayor al 95% si se sigue estrictamente el método descrito.

Bibliografía

Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines OIE, París, Francia 1992.

Jutting BS, National Veterinary Services Laboratories, USDA, APHIS, Ames, Iowa.

Título

Inmunofluorescencia directa para diagnóstico de Fiebre Porcina Clásica (FPC) en cortes por congelación.

Objetivo

La prueba se utiliza para la detección del virus de la Fiebre Porcina Clásica.

Campo de aplicación

Para la confirmación del diagnóstico clínico de FPC como apoyo a la Campaña Nacional contra la FPC.

Documentos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica.

Generalidades

Detectar el antígeno viral de FPC por medio de un conjugado de inmunoglobulinas IgG (suero hiperinmune) conjugado con isotiocianato de fluoresceína, que al ponerse en contacto con el tejido sospechoso: tonsilas, nódulo linfático y bazo va a unirse a la fracción antigénica del virus de la FPC efectuándose la unión Ag-Ac, dicha reacción se observa por medio del microscopio de fluorescencia.

Equipo e instrumentos

1. Congelador con temperatura de 0 a -20°C.
2. Criostato
3. Estufa bacteriológica con rango de 22 a 40°C.
4. Microscopio de fluorescencia

Materiales

1. Caja para portaobjetos con perforaciones en la tapa y papel filtro (cámara húmeda)
2. Cubreobjetos
3. Jarra de Coplin
4. Pinzas
5. Portaobjetos
6. Tijeras

Reactivos:

1. Acetona
2. Glicerina
3. Solución amortiguada de fosfatos (SAF) pH 7.2

Biológicos

1. Conjugado de FPC con título de trabajo, mínimo de 1:4.
2. Cortes congelados de tonsilas positivos y negativos.

Condiciones ambientales

De laboratorio con temperatura óptima de 18 a 25°C.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Tejido de estudio: tonsilas, bazo o ganglio linfático.

Los tejidos de elección son las tonsilas, nódulo linfático y bazo. Las muestras deben colocarse en envases con sello hermético y conservarse en refrigeración.

Procedimiento

- Montar un corte de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente con gelatina y congelar en el criostato a -20°C.
- Realizar cortes de 4 a 5 micras de espesor y colocarlas en portaobjetos.
- Fijar con acetona en congelación por 10 min.
- Secar y teñir los cortes, con el conjugado junto con los testigos positivos y negativos.
- Incubar a 37°C por 30 min. en cámara húmeda.
- Lavar de 4 a 5 veces con PBS.
- Lavar con agua destilada y secar al medio ambiente.
- Montar con glicerina buferada.
- Observar en microscopio de fluorescencia.

Interpretación de resultados

La fluorescencia específica se observa exclusivamente en el citoplasma de las células epiteliales de las criptas tonsilares y/o en células linfoides de los nódulos linfoides.

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor al 95% si se sigue estrictamente el método descrito.

Bibliografía

Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, OIE. París, Francia 1992.

Título

Prueba de Inmunoperoxidasa para detección de anticuerpos contra el virus de la Fiebre Porcina Clásica (FPC).

Objetivo

La prueba se utiliza para la detección de anticuerpos séricos contra el virus de la Fiebre Porcina Clásica por la técnica inmunoenzimática-peroxidasa.

Campo de aplicación

Diagnóstico y/o monitoreo de piaras, como parte de la Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica.

Documentos conexos a consultarse.

Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica.

Generalidades

Detectar anticuerpos contra el virus de la FPC basado en los principios de la prueba de ELISA, en monoestratos de líneas celulares sensibilizadas con el virus de FPC.

Los anticuerpos específicos contra éste, que estén presentes en el suero sanguíneo, efectuarán la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac).

Un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (proteína G conjugada), se fija a la porción fijadora del complemento de los anticuerpos permitiendo la reacción enzimática al agregar el Sustrato.

La peroxidasa activa al indicador por lo que el citoplasma de las células, debe mostrar una coloración específica, en caso de haber anticuerpos contra el virus de la FPC en el suero problema.

Equipo e instrumentos

1. Estufa bacteriológica con rango de temperatura de 22°C a 40°C.
2. Micropipeta uni o multicanales de 1 a 50 y de 50 a 250 microlitros
3. Microscopio de luz invertida

Materiales

1. Marcadores de tinta indeleble
2. Microplacas de plástico, con 96 pozos, fondo plano
3. Pipetas de 5, 10 y 20 ml.
4. Probetas de 100 ml.
5. Puntas para multipipeta

Materiales

1. Frascos de vidrio de 10, 50, 100 y 500 ml.
2. Marcadores con tinta indeleble
3. Microplacas de 96 pozos de fondo en "U"
4. Pipetas de 1, 5, 10 y 20 ml.

5. Puntas para micropipeta
6. Recipiente con tapa para incubación de microplacas (cámara húmeda)
7. Toallas absorbentes de papel.

Reactivos:\*

1. Indicador.
2. Microplacas con monoestrato de células PK15 u otra línea celular con características similares, sensibilizadas con el virus de la FPC.

3. Proteína G conjugada.
4. Solución A y B.
5. Solución de dilución.
6. Solución de lavado.
7. Suero testigo negativo.
8. Suero testigo positivo.
9. Sustrato.

Condiciones ambientales

De laboratorio con temperatura óptima de 18 a 25°C.

Preparación y acondicionamiento de la muestra.

Sueros para estudio conservados en refrigeración o congelación, sin inactivar.

Procedimiento

Preparación de los reactivos de acuerdo al instructivo de los kits de inmunoperoxidasa comercializados por la PRONABIVE.

- Realizar diluciones de los sueros problema y de los testigos positivos y negativos 1:10 (20 microlitros de suero y 180 microlitros de solución de dilución).
- Descongelar una microplaca sensibilizada durante 5 min. a medio ambiente y lavar en tres tiempos con solución de lavado.
- Secar bien las microplacas con toallas absorbentes y adicionar 50 microlitros por pozo (3 pozos; 1 testigo negativo y 2 infectados) de los sueros problema previamente diluidos 1:10, así como de los sueros testigo positivo y negativo.
- Incubar la microplaca a 37°C por 45 min. en cámara húmeda.
- Retirar de la incubación las microplacas y decantar los sueros, lavar en tres tiempos con solución de lavado.
- Secar las microplacas con toalla absorbente y adicionar 50 microlitros de proteína G conjugada, diluida 1:500 en solución de dilución.
- Incubar a 37°C por 30 min. en cámara húmeda.
- Retirar de la incubación las microplacas, decantar la proteína y lavar en tres tiempos con solución de lavado.
- Secar las microplacas con papel absorbente y adicionar 50 microlitros del indicador diluido en la solución A y B más el sustrato, el indicador debe ser preparado en el momento que se va a adicionar.
- Tapar las microplacas e incubar a temperatura ambiente por 20 min.
- Realizar las lecturas en el microscopio de luz invertida.

Fórmulas de cálculo para resultados

En esta técnica no se utilizan.

Interpretación de resultados

Se considera reacción positiva cuando 2 de los pozos que contienen células infectadas, muestran por lo menos una colonia de células teñidas de color café-rojizo en su citoplasma y el núcleo permanece sin tinción.

Se considera reacción sospechosa, si uno de los pozos infectados manifiesta células teñidas, debiendo realizar nuevamente la prueba.

Se considera reacción inespecífica cuando en el pozo que contiene células no infectadas se observan células teñidas y tendrá que repetirse, haciendo más diluciones del suero 1:20 y 1:40 o realizar la prueba de ELISA y/o sueroneutralización.

Se considera reacción negativa, en el caso de que los 2 pozos que contienen células infectadas no muestren coloración.

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor a 95% si se sigue literalmente el método descrito.

Bibliografía

Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, OIE. París, Francia 1992.

Título

Inmunoensayo ligado a enzimas, ELISA, para la detección de Anticuerpos contra el virus de Fiebre Porcina Clásica (FPC).

**Objetivo**

Determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de FPC, mediante una prueba rápida y confiable.

**Campo de aplicación**

Se utiliza para efectuar las pruebas que establece la Norma Oficial Mexicana de la Campaña contra la Fiebre Porcina Clásica.

Diagnóstico Serológico de F.P.C.

Diagnóstico Diferencial de Infecciones por Pestivirus.

Documentos conexos a consultarse.

Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica.

**Generalidades**

Se utilizan 2 anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales reconoce un epítipo específico diferente de la proteína "E1", de la envoltura del virus. La placa posee un anticuerpo monoclonal específico ligado a su superficie. Una vez lavada la placa de trabajo, se adiciona un segundo anticuerpo monoclonal y además se agrega la mezcla de virus-suero problema que fue incubado previamente en una placa de cultivo celular, con poca capacidad de fijar partículas. Después de una segunda incubación se retira el inóculo, se lava la placa y se adiciona un cromógeno-sustrato.

La reacción se interpreta de la siguiente manera: si ambos anticuerpos monoclonales se unen al antígeno, la enzima peroxidasa induce una reacción cromogénica, indicando que el suero problema es negativo a anticuerpos contra el virus de F.P.C. Si uno o ambos epítopes son bloqueados por anticuerpos del suero problema, el conjugado es lavado y los pozos permanecen claros, indicando que el suero problema contiene anticuerpos contra el virus de F.P.C., en resumen: reacción con color=NEGATIVO, sin color=POSITIVO.

\* Complex-Trapping-Blocking: ELISA for detection of HOG Cholera Antibodies CEDITEST, Lelystad Holland. July 1994.

**Equipo e instrumentos**

1. Estufa bacteriológica de 37°C, con humedad
2. Impresora
3. Lector para placas de ELISA
4. Micropipeta de un solo canal 5-100 µl.
5. Micropipetas de 8 a 12 canales con capacidad de 50 a 300 µl.
6. Pipetas serológicas de 1,5 y 10 ml.
7. Potenciómetro
8. Refrigerador con capacidad mínima de 9 pies cúbicos, con congelador integrado.

**Materiales**

1. Frasco de vidrio de 50 y 100 ml.
2. Frascos de vidrio de 500 ml. con tapón de rosca
3. Microplacas de 96 pozos con un anticuerpo monoclonal ligado a la superficie preservadas con glicerol
4. Microplacas para cultivo celular de 96 pozos de fondo plano
5. Puntas de plástico para micropipeta de 300 µl. de capacidad
6. Recipientes contenedores de soluciones
7. Vaso de precipitado de 500 ml.

**Reactivos**

La mayoría de estos reactivos vienen incluidos en el Kit.

1. sueros de referencia (1: suero positivo fuerte. 2: suero positivo débil. 3: suero negativo de referencia para indicar la sensibilidad de la prueba. 4: suero negativo).

2. Acetato de sodio 0.1M
3. Acido acético
4. Acido sulfúrico 0.5M

5. Antígeno de FPC, proteína E-1 del virus de FPC.
6. Conjugado de peroxidasa-anticuerpo monoclonal.
7. Dimetil sulfoxido (DOMOSO).
8. Peróxido de hidrógeno al 30%
9. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2.
10. Suero control negativo
11. Suero equino
12. Tetra-metil-benzidine (TM.B)
13. Tween 80.

Condiciones ambientales

Temperatura de laboratorio (18-26°C), evitar corrientes de aire acondicionado o de calefacción, no trabajar bajo la luz directa del sol.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Obtener la muestra de suero lo más clara posible, es decir libre de hemólisis, no deben estar contaminados, la muestra se diluye 1:2.5 con la solución de dilución de muestras.

Procedimiento:

En una placa de cultivo celular, de 96 pozos u otra que tenga una baja capacidad de ligar partículas a su superficie que se utiliza como placa falsa.

Colocar en la columna 1 el suero negativo (75 µl.).

En la columna 2, se pone 75 µl. de suero de referencia 1 en los pozos A2 y B2, en el pozo C2 y D2, el suero de referencia 2, el suero 3 de referencia en los pozos E2 y F2 y el suero 4 en los pozos G2 y H2.

De la columna 3 en adelante, se ponen 45 µl. de solución de dilución\* y 30 µl. del suero problema (1:2.5) 80 sueros por placa.

Adicionar 75 µl. de solución de dilución a la columna 1. Adicionar 75 µl. del virus HCV-El diluido como indica el fabricante (1:30) en las columnas 2-12.

Incubar a 37°C, durante 30 minutos en cámara húmeda, previamente selladas.

Una vez transcurrido el tiempo (30 minutos), lavar la placa de trabajo 5 veces con la solución de lavado\*\* para remover el glicerol.

Depositar 50 µl. de conjugado (para una placa 5 ml. de solución de dilución+166 µl. de conjugado), en todos los pozos de la placa.

Transferir 50 µl. de la mezcla antígeno-suero de la placa falsa a la placa de trabajo, tal como están en la placa donde se llevó a cabo la incubación Ag-suero, utilizando puntas diferentes para cada suero.

Sellar e incubar a 37°C, durante 1 hora en cámara húmeda.

Una vez concluida la segunda incubación, se retira el inóculo.

Lavar 10 veces con PBS+tween 80 y se adicionan 100 µl. del cromógeno-sustrato (100 µl. TMB+10 µl. de acetato de sodio pH 6+100 µl. de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, preparada con 85 µl. de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en 5 ml. de agua destilada).

Agitar a intervalos de 2 minutos durante 10 o 20 minutos.

Detener la reacción mediante la adición de 100 µl. de ácido sulfúrico 0.5.M. en todos los pozos.

Leer inmediatamente la placa en un lector de ELISA a una Densidad Optica de 450 nm.

\*Para una placa 20 ml. PBS+ 0.05% Tween 80+2% suero equino.

\*\*Solución de lavado: 600 ml. PBS+300 µl de Tween 80, para una placa.

Fórmula de cálculo para resultados:

Los porcentajes de inhibición de los sueros de referencia de la columna 2 y la de los sueros problema se calculan de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% inh = 100 - \frac{DO \text{ suero problema}}{DO \text{ máxima}} \times 100$$

Interpretación de resultados:

- 0-30% de Inhibición = Negativos a anticuerpos contra la F.P.C.

- 31-50% de Inhibición = sospechosos. Repetir la prueba.

- 51-100% de Inhibición = Positivo a anticuerpos contra el virus de la F.P.C.

Indices de reproducibilidad y repetibilidad

Mayor de 95%, si se sigue literalmente el método descrito.

Bibliografía o referencias

G. Wensvoort, M. Bloemraad and C. Terpstra: *Veterinary Microbiology* 17: 129-140, 1988.

ELISA: Tips Técnicos: Flock Chek: Memorias del Curso de actualización en técnicas de inmunoensayo (ELISA), aplicadas al diagnóstico de enfermedades de los animales. Centro de Análisis e Investigaciones Pecuarias de La Laguna 27-29, Febrero 1996, Gómez Palacio, Dgo.

Titulo

Microseroneutralización ligada a peroxidasa (MSLP), para la detección de anticuerpos séricos contra el virus de la Fiebre Porcina Clásica (FPC).

Objetivo

Determinar cuantitativamente los anticuerpos presentes en el suero sanguíneo de cerdos que han estado en contacto con el virus de la FPC.

Campo de aplicación

Se utiliza para efectuar las pruebas que establece la Norma Oficial Mexicana de la Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica.

Esta prueba se efectúa para establecer el título de anticuerpos contra el virus de la FPC que están presentes en muestras de suero sanguíneo.

Documentos conexos a consultarse

Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria.

Norma Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica.

Generalidades

Esta prueba se lleva a cabo en microplacas en las cuales se mezclan diluciones progresivas de suero sanguíneo y de virus de la FPC, posteriormente se adicionan células de línea ST en suspensión y se incuban durante 48 horas a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para hacer evidente la reacción antígeno-anticuerpo, después de incubar, se aplica la técnica de inmunoperoxidasa utilizando un suero hiperinmune diluido, se adiciona conjugado a base de proteína G + peroxidasa y finalmente se agrega un cromógeno-sustrato.

El título de anticuerpos presentes en el suero se determina al observar el o los pozos en los cuales hay o no coloración rojiza.

Equipo e instrumentos

1. Agitador (Vortex)
2. Baño María con regulador de temperatura
3. Centrífuga
4. Estufa bacteriológica con suministro de CO<sub>2</sub> y humedad relativa al 70%
5. Micropipetas de un canal y de 8 y 12 canales de 50-200 ml.
6. Microscopio de luz invertida
7. Refrigerador con congelador integrado de 9 pies cúbicos

Materiales

1. Botellas de cultivo celular de 15, 30 y 100 ml.
2. Botellas de vidrio de 50, 100 y 500 ml.
3. Gradilla para tubos de 13 x 100 mm.
4. Microplacas de fondo plano de 96 pozos para cultivo celular
5. Tubos de vidrio de 13 x 100 mm.

Biológicos:

1. Células de línea de testículo de cerdo ST
2. Suero fetal bovino libre de anticuerpos contra los virus de la FPC y contra la diarrea viral bovina
3. Suero hiperinmune específico contra FPC
4. Virus de la fiebre porcina clásica adaptado a laboratorio. Ejemplo cepa E.

Reactivos

1. Acetona (200 ml de acetona + 800 ml de SAF 0.01 pH, 7.2 + 0.2 y albúmina sérica de bovino).
2. Bicarbonato de sodio al 7%
3. Conjugado de proteína E + peroxidasa
4. Cromógeno 3 amino 9 etil carbazol

5. L-glutamina
6. Medio Mínimo esencial (MEM) de Eagle
7. Solución A y B
8. Solución de antibiótico penicilina-estreptomicina
9. Solución de dilución para el conjugado y suero hiperinmune (1 litro de solución amortiguadora de fosfatos (SAF), pH 7.2, 0.01 M + 21 y NaCl + 0.5 ml de Tween 20.
10. Solución de lavado: SAF, pH 7.2, 0.01 M, 1 litro + 5 ml de Tween 20.
11. Solución de tripsina-verseno.
12. Sustrato de peróxido de hidrógeno al 30%
13. TPB
14. Tween 20.

Condiciones ambientales

Temperatura de laboratorio (18-26°C), evitar corrientes de aire acondicionado o de calefacción, no trabajar bajo la luz directa del sol.

Preparación y acondicionamiento de la muestra

Obtener la muestra de suero lo más clara posible, es decir libre de hemólisis, no deben estar contaminados y se inactivan a 56°C por 30 minutos.

Procedimiento

Colocar en una microplaca de fondo plano, estéril de 96 pozos, 50 microlitros (mlt) de medio de dilución (MEM + 5% SFB + 2% de Na HCO<sub>3</sub>) en todos los pozos.

Agregar en la columna A, 50 mlt de suero problema.

Agregar 50 mlt de suero problema en el primer pozo de la columna 2.

Mezclar bien y transferir 50 mlt al pozo de la siguiente columna, mezclar y transferir 50 mlt al pozo de la columna 4 y así sucesivamente, hasta llegar a la última columna de la microplaca, obteniendo así diluciones de suero de 1:2 hasta 1:2048.

Adicionar 50 mlt de una suspensión de virus E, conteniendo 200 DICT 50/0.5 mlt diluido con MEM.

Mezclar en un agitador de placas durante 20 segundos.

Incubar a 37°C durante 60 minutos con 5% de CO<sub>2</sub> y 70% de humedad relativa (HR)

Adicionar 50 mlt de una suspensión de células de línea ST a una concentración de 1:2.

Para preparar la suspensión de células, decantar el medio de crecimiento o extraerlo con una bomba de vacío, de una botella de 15, 30 o 100 ml, dependiendo de la cantidad de células que se vayan a necesitar.

Lavar el monoestrato con SAF pH 7.2 a 37°C, 2 veces.

Adicionar de 5 a 10 mlt de la solución de tripsina-verseno a 37°C, humedecer bien la superficie del monoestrato y retirar rápidamente.

Añadir nuevamente 1 o 2 ml de la misma solución y dejar a 37°C durante 5-10 minutos, observando el desprendimiento de la capa de células se puede acelerar esto mediante agitación vigorosa o por golpes en la botella con la palma de la mano.

Una vez que ya se hayan desprendido las células en su totalidad, se adiciona medio de crecimiento (5% SFB+2% N-HCO<sub>3</sub>+MEM, con PB 2% L-glutamina y 2% de antibiótico), suficiente como para tener una concentración final de 1:2.

Incubar a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub> y 70% de humedad relativa, por un tiempo de 48 horas.

Descartar el medio de crecimiento.

Lavar 3 veces con solución de lavado.

Secar perfectamente con una toalla absorbente.

Fijar las células con acetona adicionando 100 mlt en todos los pozos y dejar a temperatura ambiente 10 minutos.

Retirar la acetona y secar bien a medio ambiente a 37°C 45 minutos.

Lavar con solución de lavado 3 veces.

Secar con una toalla absorbente.

Adicionar 50 mlt de suero hiperinmune diluido en la solución de dilución, dependiendo del título, de tal forma que tengamos un título final de 1:300, en todos los pozos.

Incubar 30 minutos a 37°C.

Retirar el inóculo.

Lavar 3 veces con la solución de lavado.

Agregar 50 mlt de proteína G+ peroxidasa por pozo e incubar 30 minutos a 37°C.

Adicionar 50 mlt de solución de cromógeno-sustrato.

Incubar a medio ambiente durante 15-30 minutos.

Hacer la lectura visualmente.

En casos dudosos se puede leer en el microscopio de luz invertida o en el microscopio óptico de bajo poder.

Controles:

a) Control de suero hiperinmune, diluyendo desde 10 a la 1, hasta 10 a la 5 (dependiendo del título original), inoculando 4 pozos por dilución o suero hiperinmune 50 mlt + 50 mlt de células.

b) Control de virus diluciones 10 a la 0, a 10 a la 3, infectando 4 pozos por dilución.

50 mlt virus

50 mlt células

50 mlt de MEM.

c) Control de suero positivo conocido. Se debe diluir igual que el suero problema.

50 mlt suero (+) + 50 mlt virus + 50 mlt de células.

d) Control de suero negativo conocido diluido. Se debe diluir igual que el suero problema,

50 mlt suero (-) + 50 mlt de virus + 50 mlt de células.

e) Control de células.

100 mlt de medio de crecimiento

50 mlt de células.

f) Control de suero, para checar toxicidad de las células debido a éste.

50 mlt suero problema + 50 mlt de MEM + 50 mlt de células.

CONTROL

DE SUERO

PROBLEMA

Control positivo

Control negativo

Control de  
suero hiperinmune

Control de  
células

Control de  
virus

Interpretación de resultados:

Un suero positivo se considera como tal hasta la dilución donde no hay células teñidas, ya que hasta aquí se neutralizó el virus.

La coloración se debe a que el Ag que se neutralizó reacciona con el suero hiperinmune y se une al conjugado y se hace evidente con el cromógeno.

Un suero negativo es considerado cuando los pozos de todas las diluciones son teñidos de rojo marrón.

El suero hiperinmune debe neutralizar hasta la dilución donde se obtenga el título original.

El virus control debe teñir los pozos de las columnas 10 hasta la dilución, donde tengamos las 200 DICT 50/0.05 ml que es el 50% de los pozos de la dilución.

Indice de repetibilidad:

100% se sigue el mismo procedimiento.

Bibliografía

1. Office International des Epizooties (DIE): Manual of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements for Biological Products for Lists a and B. Diseases. Vol. II 1990 (A/013).

2. Jensen, H.M. Detection of Antibodies Against Hog Cholera virus and Bovine Viral Diarrhea Virus in Porcine Serum. Acta Vet. Scand. 22: 85-98. (1981).

3. Terpstra, C., Bloemraad, M. and Gielkens, AL.J. The Neutralizing Peroxidase - Linked Assay for Detection of Antibody Against Swine Fever Virus. Veterinary Microbiology 9: 113-120 (1984).

4. Adams, R.L.P. Cell Culture for Biochemists in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 8, Edited by: Burdon, R.H. and Knippenberg, P.H. van 2a. Ed. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical division) 1990.

5. Jutting, B.S.: Inmunoperoxidase Screening Test for Hog Cholera Antibodies National Veterinary Services Laboratories, USDA, APHIS, AMES, IOWA.

6. Eernisse, K.A. and Erickson, G.A. Microtitration Serology Methods for Bovine Virology.

#### **16. Sanciones**

El incumplimiento a las disposiciones contenidas en la presente Norma, será sancionado conforme con lo dispuesto en la Ley Federal de Sanidad Animal y la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

**17. Concordancia con normas internacionales**

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente a alguna norma internacional.

**18. Disposiciones transitorias**

La presente Norma entrará en vigor a los 30 días posteriores a su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 31 de diciembre de 1998.- El Director General Jurídico de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, **Jorge Moreno Collado**.- Rúbrica.