



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

VALIDACIÓN DEL USO DE PAPEL FILTRO DE NOBUTO PARA LA
COLECTA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS EN LA EVALUACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE INDICADORES DE SALUD EN GANADO DE
TODOS SANTOS, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO.

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biología Marina)

Presenta

Valeria Beltrán Valdivia

La Paz, Baja California Sur, Agosto 2021

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 17 horas del día 22 del Mes de Mayo del 2021, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"VALIDACIÓN DEL USO DE PAPEL FILTRO DE NOBUTO PARA LA COLECTA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS EN LA EVALUACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE INDICADORES DE SALUD EN GANADO DE TODOS SANTOS, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO"

Presentada por el alumno:

Valeria Beltrán Valdivia

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **BIOLOGÍA MARINA.**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Tania Zenteno Savín
Director de Tesis



Dr. Todd O'Hara
Co-Tutor



Dr. Ramón Gaxiola Robles
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 11 de julio de 2021.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Valeria Beltrán Valdivia del Programa de Maestría en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el VoBo dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Citas excluidas
Bibliografía excluida
- Porcentajes de similitud:
18%
Se muestra captura de pantalla

INFORME DE ORIGINALIDAD		
18% ÍNDICE DE SIMILITUD		
FUENTES PRIMARIAS		
1	documentop.com Internet	242 palabras — 2%
2	doku.pub Internet	129 palabras — 1%
3	www.fao.org Internet	93 palabras — 1%
4	www.gob.mx Internet	93 palabras — 1%
5	docplayer.es Internet	82 palabras — 1%
6	www.slideshare.net Internet	74 palabras — 1%
7	pinnacle.allenpress.com Internet	69 palabras — 1%
8	cibnor.repositorioinstitucional.mx Internet	67 palabras — 1%

Firmas del comité



Dra. Tania Zenteno Savín
Directora de tesis



Dr. Ramón Gaxiola Robles
Co-tutor



Dr. Todd M. O'Hara
Co-tutor



Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Tania Zenteno Savín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Directora de Tesis

Dr. Ramón Gaxiola Robles
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutor

Dr. Todd Michel O'Hara
Texas A&M University
Co-Tutor

Comité Revisor de Tesis

Dra. Tania Zenteno Savín
Dr. Ramón Gaxiola Robles
Dr. Todd Michel O'Hara

Jurado de Examen

Dra. Tania Zenteno Savín
Dr. Ramón Gaxiola Robles
Dr. Todd Michel O'Hara

Suplente

Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril

Resumen

La colecta de muestras biológicas en campo puede ser difícil. El uso del papel filtro de Nobuto es una alternativa ya que permite la colecta de fluidos biológicos de manera simple y rápida. Se colectaron muestras de sangre y leche de bovinos (n=11) y caprinos (n=27) provenientes de 3 ranchos de Todos Santos, Baja California Sur, México. La sangre se obtuvo por extracción venosa yugular o coccígea en tubos Vacutainer® con heparina como anticoagulante y la leche se obtuvo por ordeña manual en tubos de plástico estériles. Tiras de papel filtro Nobuto® se saturaron con sangre o leche y se dejaron secar al aire. Previo al análisis, cada tira se sumergió en solución salina y se eluyó durante la noche en refrigeración. Se usaron los datos de las muestras de sangre y leche colectadas por métodos tradicionales como estándares. Todas las muestras se procesaron para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* y *Anaplasma spp.* por medio de pruebas serológicas, y para la cuantificación de la concentración de proteínas totales, glutatión (GSH-Eq, GSH, GSSG), carbonilos proteicos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como indicadores de estrés oxidativo. No se detectaron anticuerpos para *Brucella abortus* y *Anaplasma spp.* en las muestras de leche y sangre; por lo tanto, no se analizaron las muestras del papel filtro. Los resultados sugieren que los animales incluidos en este estudio están sanos y libres de brucelosis y anaplasmosis. Se detectaron indicadores de estrés oxidativo por primera vez en papel filtro con una frecuencia relativa >75%. Las concentraciones de GSH-Eq, GSH, GSSG, TBARS y carbonilos proteicos preservados en el papel filtro de Nobuto no fueron comparables con su estándar de referencia. Las muestras de sangre preservadas en el papel filtro se pueden usar para la evaluación del estado redox por medio de la tasa GSSG:GSH-Eq. El papel filtro de Nobuto es un método apropiado para analizar moléculas más estables.

Palabras clave: *papel filtro, Nobuto, estrés oxidativo, anticuerpos, ganado*

Número ORCID – 0000-0001-5553-3830


Vo. Bo. Dra. Tania Zenteno Savín
Directora de Tesis

Summary

Collecting biological samples at remote field sites with limited processing capabilities can be problematic. The use of Nobuto filter paper is an alternative to collect samples in different environmental conditions, contributing to facilitate clinical, research and biomonitoring efforts. Drying the filter paper facilitates transport and allows for simple storage. The objective of this study was to validate the use of Nobuto filter paper for the collection of blood and milk from livestock. Blood and milk samples were collected from cattle (n=11) and goats (n=27) in 3 ranches of Todos Santos, Baja California Sur, Mexico. Blood was obtained by jugular or coccygeal venipuncture with heparin as an anticoagulant. The milk was obtained by manual milking in sterile plastic tubes. From each sample, an aliquot was collected in Nobuto filter paper by soaking 15 strips per sample. The filter paper was air dried at room temperature and stored in labeled envelopes for shipping and further analysis. The remaining samples were processed following conventional methods and frozen for transport and subsequent analysis. Prior to analysis, each filter paper strip was immersed in saline and eluted overnight under refrigeration. All samples were processed following the same methods for the detection of antibodies against *Brucella abortus* and *Anaplasma spp.* by serological tests, and quantification of the concentrations of total proteins, glutathione (GSH-Eq, GSH, GSSG), protein carbonyls and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as indicators of oxidative stress. No antibodies were detected for *Brucella abortus* and *Anaplasma spp.* in milk and blood samples; therefore, the filter paper samples were not analyzed. The results suggest that the animals included in this study are healthy and free from brucellosis and anaplasmosis. Indicators of oxidative stress were detected for the first time on filter paper with a relative frequency >75%. The concentrations of GSH-Eq, GSH, GSSG, TBARS and protein carbonyls preserved on Nobuto filter paper were not comparable with their gold standard. Blood samples preserved in Nobuto filter paper may be used for the evaluation of the redox status from the GSSG:GSH-Eq ratio. Nobuto filter paper is a suitable method for analyzing more stable molecules.

Keywords: filter paper, Nobuto, oxidative stress, antibodies, livestock

ORCID number – 0000-0001-5553-3830


Vo. Bo. Dra. Tania Zenteno Savín
Directora de Tesis

Dedicatoria

A mis padres, por acompañarme y apoyarme en todo momento. Su ejemplo de trabajo duro y perseverancia son mi mayor motivación para alcanzar mis metas y dar siempre lo mejor de mi.

Todos mis logros son para ustedes.

Gracias.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada No.715338.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR) por la oportunidad de formar parte de la institución y realizar mis estudios de Maestría.

Al financiamiento de mi investigación a través del proyecto CIBNOR-20292.

Al departamento de Posgrado: Lic. Osvelia Ibarra, Tania Núñez Valdez y Lic. Leticia Gonzalez por las facilidades y atenciones brindadas.

Al equipo del Laboratorio de Estrés Oxidativo, en especial al IBQ. Orlando Lugo, por su apoyo técnico en el procesamiento de muestras.

Al equipo de la Universidad Estatal de Colorado, Campus Todos Santos: MVZ. Elia Alvarez y Dra. Danielle Frey por su excelente disposición para realizar el trabajo de campo.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Tania Zenteno Savín, Dr. Todd M. O'Hara y Dr. Ramón Gaxiola Robles por su aliento y motivación en todo momento. Gracias por guiarme hacia el camino de la ciencia.

A mis amigos y compañeros por sus consejos, buenos momentos y noches de desvelo durante estos años.

A mi familia por su apoyo incondicional y ser mi mas grande inspiración. Gracias por acompañarme siempre y confiar en mi capacidad.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	viii
Abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	12
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS.....	17
5. OBJETIVOS.....	18
5.1. Objetivo general.....	18
5.2. Objetivos particulares	18
5.2.1. Objetivo particular 1	18
5.2.2. Objetivo particular 2	18
5.2.3. Objetivo particular 3	18
5.2.4. Objetivo particular 4	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS	19
6.1. Área de estudio	19
6.2. Toma de muestra	19
6.2.1. Estándar de referencia	19
6.2.2. Papel filtro de Nobuto.....	20
6.3. Procesamiento de muestras.....	20
6.3.1. Estándar de referencia	20
6.3.2. Papel filtro de Nobuto.....	20
6.4. Análisis serológicos	21
6.4.1. <i>Brucella abortus</i>	21
6.4.2. <i>Anaplasma spp.</i>	21
6.5. Indicadores de estrés oxidativo	22
6.5.1. Glutación.....	22
6.5.2. Daño oxidativo a proteínas	23
6.5.3. Daño oxidativo a lípidos	23
6.5.4. Determinación de proteínas totales	24
6.5.5. Determinación de hemoglobina total	24
6.6. Cálculos y análisis estadísticos	24
6.6.1. Factor de corrección	24
6.6.2. Análisis estadísticos.....	25
7. RESULTADOS.....	26
7.1. Análisis serológicos	26
7.2. Indicadores de estrés oxidativo	28
7.2.1. Asociación entre el estándar de referencia y las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto.....	30

8. DISCUSIÓN	32
8.1. Análisis serológicos	32
8.1.1. Brucella spp.	32
8.1.2. Anaplasma spp.	33
8.2. Indicadores de estrés oxidativo	34
8.2.1. Indicadores de estrés oxidativo en sangre.....	35
8.2.2. Indicadores de estrés oxidativo en leche.....	37
9. CONCLUSIONES	40
9.1. Recomendaciones	40
10. LITERATURA CITADA	42

Lista de figuras

Figura 1. Tira de papel filtro de Nobuto compuesta de (A) área de difusión (10 x 20 mm) y de (B) área de adsorción de la muestra (5 x 30 mm).	13
Figura 2. Ubicación de los ranchos en Todos Santos, Baja California Sur, México en donde se colectaron muestras de sangre y leche de ganado. Las Playitas (23° 32' 21.8" N, 110° 17' 51.91" W), Los Cascabeles (23° 27' 41.52" N, 110° 10' 0.4" W) y El Tunar (23° 27' 49.87" N, 110° 7' 54.01" W).	19
Figura 3. Ensayo de polarización de fluorescencia (mP) para identificar anticuerpos contra <i>Brucella spp.</i> en muestras de plasma colectado con los métodos tradicionales (estándar de referencia) de ganado bovino y caprino de Todos Santos, Baja California Sur, México.	27
Figura 4. Ensayo de inmunoadsorción competitivo ligado a enzimas (c-ELISA) para identificar anticuerpos contra <i>Anaplasma spp.</i> en muestras de plasma colectado con los métodos tradicionales (estándar de referencia) de ganado bovino y caprino de Todos Santos, Baja California Sur, México.	28
Figura 5. Frecuencia relativa de los indicadores de estrés oxidativo detectados en el papel filtro para las muestras de sangre (A) y leche (B) en relación con su estándar de referencia. Abreviaturas: GSH-Eq, glutatión total; GSSG, glutatión oxidado; PT, proteínas totales; TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúico; PC, proteínas carboniladas.	29
Figura 6. Relación lineal entre las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto (PF) y el estándar de referencia (ER) para la concentración de proteínas totales ([proteinas totales], nmol/mL) en muestras de leche de ganado colectadas en Todos Santos, Baja California Sur. Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza al 95%. A todos los datos de las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto se les aplicó un factor de corrección (ver sección Materiales y Métodos).	30
Figura 7. Estado zoonosológico de la brucelosis en México (80).....	33
Figura 8. Estado zoonosológico de la garrapata <i>Boophilus spp.</i> en México (82).	34

Lista de tablas

Tabla 1. Parámetros considerados para garantizar el bienestar animal en el ganado (20).	3
Tabla 2. Descripción del estallido respiratorio (33, 34, 40, 41).	7
Tabla 3. Comparación de métodos de colecta de sangre completa en el muestreo de animales vivos.	12
Tabla 4. Prueba de aglutinación en tarjeta para identificar anticuerpos contra <i>Brucella abortus</i> en plasma colectado con los métodos tradicionales (estándar de referencia) de ganado bovino y caprino ($n = 38$) de Todos Santos, Baja California Sur, México.	26
Tabla 5. Comparación de los indicadores de estrés oxidativo cuantificados en muestras de sangre y leche colectados por los métodos tradicionales (estándares de referencia) y en papel filtro de Nobuto de ganado bovino y caprino ($n = 38$) de Todos Santos, Baja California Sur.	31
Tabla 6. Composición de ácidos grasos en leche (91) y sangre (90) de ganado.	36

Abreviaturas

CAT	Prueba de aglutinación en tarjeta
Cl⁻	Ion cloro
CaCl	Carbonato de calcio
DBS	Gotas de sangre seca
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2(2-nitrobenzoico)
DNPH	2,4-dinitrofenil hidracina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
c-ELISA	Ensayo competitivo inmunoabsorbente ligado a enzimas
i-ELISA	Ensayo indirecto inmunoabsorbente ligado a enzimas
FPA	Ensayo de polarización de fluorescencia
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSH-Eq	Glutación total
GSSG	Glutación oxidado
H⁺	Catión hidrógeno
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorhídrico
HO⁻	Anión hidróxido
HUFA	Ácidos grasos altamente saturados
KPI	Solución amortiguadora de fosfatos
MDA	Malondialdehído
MgCl	Cloruro de magnesio
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
N₂	Nitrógeno gaseoso
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NOX	Nicotinamida adeninda dinucleótido fosfato oxigenasa
NH₃	Amoníaco

OIE	Oficina Internacional de Epizootias
O₂	Oxígeno
O₂^{•-}	Radical superóxido
OCI	Hipoclorito
•OH	Radical hidroxilo
PBS	Salución salina amortiguada con fosfatos
PT	Proteínas totales
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RNH₂	Aminas
RNH₂Cl	Cloraminas
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SFA	Ácidos grasos saturados
SINIIGA	Sistema Nacional de Identificación Individual de Ganado
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico
TCA	Ácido tricloroacético
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
WAHIS	Sistema Mundial de Información Zoonosanitaria

1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción pecuaria son considerados la estrategia social, económica y cultural más apropiada para mantener el bienestar de las comunidades. Esta actividad puede simultáneamente proveer seguridad en el sustento diario, conservar ecosistemas, promover la conservación de la vida silvestre y satisfacer los valores culturales y tradiciones (1).

El ganado es el conjunto de animales criados por el humano para la producción de carne y sus derivados. En México, está representado principalmente por el ganado vacuno, ganado ovino, ganado porcino, ganado caprino y ganado equino. Se puede dividir en 3 grupos según el tipo de producción; lácteos, carne y doble propósito (2). Las regiones donde se produce la mayor cantidad de ganado en México son la región tropical del sur con hasta el 42% de la producción total nacional; la región central templada con el 31% de la producción, y la región menos productiva es la norte árida-semiárida con el 27% (2).

En Baja California Sur, las condiciones para la producción ganadera son de bajo rendimiento. Las características de esta región incluyen escasas precipitaciones (142 mm promedio anuales) (3), altas temperaturas y suelos pobres en vegetación. En las zonas áridas, como Baja California Sur, el pastoreo libre es uno de los principales sistemas de producción ecológicamente sostenibles y se caracteriza, sobre todo, por la movilidad de los animales y el uso compartido de los recursos naturales (4). Más del 90% de la materia seca consumida por el ganado doméstico proviene de tierras de pastoreo (5). Las tierras de pastoreo son aquellas donde la vegetación nativa está constituida predominantemente por pastos, plantas con aspecto de pastos, malezas o arbustos (6). En la delegación de Todos Santos, la producción ganadera suele ser para consumo local, siendo los productos lácteos y derivados el principal objetivo de los animales, mientras que la carne es generada como subproducto (2).

El ganado provee una cantidad de servicios ecosistémicos. La ganadería, más que un simple medio para producir recursos y productos para el consumo es parte integral de nuestros ecosistemas, la comunidad biótica, y aporta beneficios sociales y económicos. El hombre ha dependido de los rumiantes para obtener alimento, subproductos y servicios; al mismo tiempo, los rumiantes han dependido del hombre para su bienestar.

Las ventajas nutricionales que aportan productos animales, como la carne y la leche, son superiores a aquellas otorgadas al consumir una dieta basada en plantas ya que son ricos en proteínas y proporcionan un balance apropiado de diez aminoácidos esenciales (7). Algunas especies de rumiantes sirven como fuente renovable de energía; se utilizan como animales de tiro para equipo agrícola, carretas y carretones (6). Los cueros y pieles de los animales se procesan para generar productos para el vestuario y confort, incluyendo zapatos, ropa, muebles y otros productos (8). En zonas rurales, el ganado aporta mayor valor estético a los paisajes que en aquellas zonas donde el campo es exclusivamente para cultivo (9). El vínculo de las personas con los animales suele ir más allá del valor monetario (10).

La integración del ganado en la preservación de los ecosistemas al promover el uso del forraje puede proporcionar grandes beneficios. El ganado puede crear alimentos humanos a partir de fuentes no comestibles. Aunque el ganado puede competir con nosotros por la comida, también asimila la biomasa no comestible de praderas desérticas para producir alimentos de valor nutricional ricos en proteína (8, 11), y proporcionan una fuente importante de nutrientes al suelo. La mayoría del nitrógeno y otros nutrientes son excretados por los animales reciclándolos de regreso a la tierra, para mantener la fertilidad del suelo (12). Además de reciclar nutrientes, el ganado también proporciona una forma de regresar a la tierra materia orgánica, como residuos de cultivos, granos o desechos del procesamiento de alimentos (8,13).

El ganado puede ayudar a mantener la biodiversidad (14). Ecosistemas complejos, como pastizales, necesitan perturbaciones continuas suaves; por lo tanto, el pastoreo del ganado se convierte en un agente de alteración restaurativa, un instrumento de conservación y renovación (15) ayudando no sólo a la vegetación, sino también a otras especies que van desde microbios hasta mamíferos (16).

La crianza del ganado y actividades agrícolas relacionadas a la comercialización, procesamiento, distribución y venta de animales y sus productos, genera gran cantidad de autoempleos y empleos a pequeños productores y agricultores (6). Estos empleos proporcionan seguridad y estabilidad económica y social ya que actúan como un “banco de ahorros” en comunidades de escasos recursos. Aunque existen muchos beneficios al interactuar con el ganado, los animales pueden transmitir microorganismos dañinos que pueden causar una variedad de enfermedades en las personas, desde infecciones leves hasta enfermedades graves (17).

Existe una creciente preocupación pública por el bienestar de los animales. El bienestar animal se define como el estado del individuo respecto a sus intentos de enfrentar el ambiente en el que se encuentra (18). Según la Organización Mundial de Sanidad Animal, antes Oficina Internacional de Epizootias (OIE), el bienestar animal es el estado físico y mental de un animal en relación con las condiciones en que vive y muere (19). El bienestar es multidimensional, por lo tanto, su evaluación corresponde a varios criterios. En los animales domésticos, como el ganado, el bienestar animal comprende diferentes parámetros agrupados en 4 principios básicos y 12 criterios (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros considerados para garantizar el bienestar animal en el ganado (20).

Principios	Criterios
Buena alimentación	Ausencia de hambre prolongada Ausencia de sed prolongada
Buen alojamiento	Confort durante el descanso Confort térmico Facilidad de movimiento
Buena salud	Ausencia de lesiones Ausencia de enfermedades Ausencia de dolor inducido por el manejo
Comportamiento adecuado	Expresión de la conducta social Buena relación humano-animal Estado emocional positivo

La salud se define como el estado en que el organismo ejerce normalmente todas sus funciones naturales. En el ganado se refiere al bienestar fisiológico, la ausencia de enfermedades, infecciones, lesiones o dolor. Existen diferentes tipos de enfermedades: enfermedades infecciosas y no infecciosas. Las enfermedades infecciosas son causadas por agentes patógenos específicos como virus, bacterias u hongos y parásitos pueden ser transmisibles al ser humano. Las enfermedades no infecciosas se refieren a aquellas causadas por anomalías genéticas, deficiencias alimentarias, enfermedades metabólicas o enfermedades tóxicas, debido a la ingestión de determinados agentes tóxicos orgánicos e inorgánicos (21).

De la necesidad de combatir las enfermedades de los animales a nivel mundial surgió el Sistema Mundial de Información Zoonosaria (WAHIS, por sus siglas en inglés), organización

intergubernamental encargada de mejorar la sanidad animal en el mundo. La interfaz WAHIS proporciona información de enfermedades o infecciones de declaración obligatoria a la OIE para animales terrestres y acuáticos. Según el WAHIS, las enfermedades presentes en México de declaración obligatoria para animales domésticos son anaplasmosis bovina, babesiosis bovina, brucelosis (por *Brucella abortus* y *B. melitensis*), influenza aviar, tuberculosis y rabia (19).

En México, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) es la institución encargada de mantener y mejorar el estado zosanitario del país a través de la prevención, control y erradicación de plagas y enfermedades que afectan al sector pecuario, acuícola y pesquero. Para lograr este objetivo, SENASICA establece políticas, lineamientos y normatividad en actividades en campo con las campañas zosanitarias; en investigación con medicina preventiva y diagnóstico, y de manera comercial en aspectos de exportación e importación (22). Actualmente, los programas de campañas zosanitarias oficiales en territorio nacional incluyen a la influenza aviar, tuberculosis bovina, brucelosis, rabia parálitica bovina, anaplasmosis, babesiosis (*Boophilus spp.*) y la varroosis de las abejas (23).

La brucelosis es una zoonosis bacteriana causada por especies del género *Brucella*. Hay seis especies diferentes de *Brucella* patógenas para animales; *Brucella abortus* es la especie predominante que infecta al ganado. Cabras, ovejas, cerdos, búfalos, camellos, renos y otros mamíferos, además de los bovinos, pueden ser afectados por brucelosis. En las especies de ganado, el mayor signo clínico de esta enfermedad es el aborto (interrupción del embarazo prematuro o a término, produciendo terneros muertos), generalmente en la segunda mitad de la gestación con retención de placenta y metritis. La infección por *Brucella spp.* se transmite fácilmente a los seres humanos, causando una enfermedad febril aguda (fiebre ondulante) que puede progresar a una forma más crónica, y también puede producir complicaciones graves que afecten a los sistemas musculoesquelético, cardiovascular y nervioso central (24). La infección se adquiere esencialmente por vía oral, respiratoria o conjuntival; pero la ingestión de productos lácteos crudos constituye la principal fuente de contagio.

El diagnóstico de brucelosis se confirma mediante el aislamiento y la identificación del organismo causante. Sin embargo, este enfoque requiere tiempo y las pruebas específicas necesarias para caracterizar las bacterias son complicadas. Para examinar un número elevado de animales, las pruebas de diagnóstico deben ser económicas, fáciles de realizar, rápidas,

sensibles y específicas. Se han diseñado varias pruebas serológicas para cumplir con estos requisitos (25). Las pruebas de antígeno de *Brucella spp.* amortiguadas (prueba de rosa de bengala y prueba de aglutinación en placa), la prueba de fijación del complemento, las pruebas de inmunoabsorción ligada a enzimas o la prueba de polarización de fluorescencia son pruebas adecuadas para rebaños y pequeños rumiantes (24). La brucelosis es una de las enfermedades bacterianas que recibe mayor atención en México. La importancia de la brucelosis radica en las pérdidas de producción derivadas de la enfermedad clínica en el ganado, las restricciones aplicadas a los animales infectados y sus productos en los mercados agrícolas locales y globales (26).

La anaplasmosis es una enfermedad transmitida por vectores causada por bacterias del género *Anaplasma*. La especie *A. marginale* es responsable de casi todos los brotes de enfermedades clínicas, aunque se ha sugerido que *A. centrale* y *A. phagocytophilum* también infectan al ganado (27). La enfermedad clínica es más notable en el ganado bovino, pero otros rumiantes como cabras, ovejas, equinos y otros mamíferos pueden infectarse de forma persistente (28). La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa pero no contagiosa, se transmite biológicamente a través de picaduras de garrapatas o se transfiere mecánicamente por moscas a través de sangre infectada. La anemia, la pérdida de peso y la ictericia son signos característicos de la anaplasmosis (29). La anaplasmosis bovina está presente en el ganado de México, América Central, Sudamérica, y en el Caribe (30). Una vez infectado, el ganado puede seguir siendo portador de por vida, y la identificación de estos animales depende de la detección de anticuerpos específicos mediante pruebas serológicas. Se ha demostrado que un ensayo competitivo inmunoabsorbente ligado a enzimas (c-ELISA, por sus siglas en inglés) tiene buena sensibilidad para detectar animales portadores. También se pueden utilizar pruebas de aglutinación en tarjeta (CAT, por sus siglas en inglés) o un ensayo indirecto inmunoabsorbente ligado a enzimas (i-ELISA, por sus siglas en inglés). La reactividad cruzada entre *Anaplasma spp.* puede complicar la interpretación de las pruebas serológicas. En general, el c-ELISA tiene la mejor especificidad, con una reactividad cruzada caracterizada sólo entre *A. marginale* y *A. centrale* (27). Infecciones graves en el ganado por *Anaplasma spp.* producen graves pérdidas económicas por disminución de la ganancia de peso, producción de leche y deterioro de las pieles, provocando en ocasiones la muerte de los animales (28).

Como mecanismo de defensa, contra infecciones por patógenos; células del sistema inmunológico innato (macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos y células dendríticas) producen sustancias altamente reactivas las cuales promueven la degradación de patógenos por medio de fagocitosis (31). Este proceso fagocítico consta de tres pasos, el reconocimiento del patógeno que ha sido recubierto con opsoninas, la absorción del patógeno seguido de la desgranulación de los leucocitos, y la destrucción y degradación del patógeno (32).

Cuando las células fagocíticas se exponen a ciertos estímulos, experimentan cambios notables en la forma en que manejan el oxígeno (33). Sus tasas de consumo de oxígeno aumentan considerablemente, a veces más de 50 veces, como respuesta comienzan a producir grandes cantidades de especies reactivas. A esta serie de cambios se le conoce como "estallido respiratorio", cuyo propósito final es generar poderosos agentes microbicidas mediante la reducción parcial de oxígeno (34). El proceso detallado y las reacciones que ocurren dentro del fagolisosoma para la generación de especies reactivas se describen en la Tabla 2.

La capacidad de las especies de oxígeno reactivas derivadas de fagocitos para eliminar patógenos ha sido establecida, y algunos de los mecanismos por los cuales esto ocurre ahora son conocidos (33). La exposición a especies reactivas pueden dañar o alterar funciones celulares en proteínas (35), ácidos nucleicos y lípidos (36). Para evitar el daño celular por estos procesos, la mayoría de los sistemas biológicos han desarrollado una respuesta antioxidante, la cual previene o repara la oxidación de alguno de estos sustratos (37). El tripéptido glutatión, así como las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa representan uno de los sistemas antioxidantes intracelulares más importantes en la defensa antioxidante.

Al desbalance entre la producción de especies reactivas y antioxidantes, a favor de los primeros, es lo que conocemos como estrés oxidativo (38). La deficiencia de antioxidantes como el glutatión, contribuye a un daño oxidativo, que desempeña un papel fundamental en el envejecimiento y patogenia de muchas enfermedades (39).

Las enfermedades que afectan al ganado pueden tener un efecto devastador sobre la productividad y la producción de los animales, sobre el comercio de animales vivos, carne y otros productos, sobre la salud humana y, por lo tanto, en el proceso general del desarrollo económico (40). Las enfermedades animales con implicaciones para la salud humana pueden

afectar negativamente la salud pública, el comercio mundial y la estabilidad del segmento agrícola de la economía. Los animales sanos tienen más probabilidades de suministrar alimentos seguros, tener mayor productividad agrícola, reducir el impacto ambiental, reducir el uso de antibióticos y mejorar el bienestar animal (41).

Tabla 2. Descripción del estallido respiratorio (33, 34, 40, 41).

Descripción	Reacción
El estallido respiratorio comienza con la activación la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxigenasa (NOX), que cataliza la reducción del oxígeno a radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$).	$O_2 + NADPH \rightarrow O_2^{\bullet-} + NADP^+ + H^+$
La mayor parte del $O_2^{\bullet-}$ reacciona rápidamente consigo mismo, en una reacción de dismutación espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) para dar un producto oxidado (oxígeno, O_2) y un producto reducido (peróxido de hidrógeno, H_2O_2).	$2 O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
El $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 son intermediarios del estallido respiratorio, ya que el primero es completamente inocuo y el segundo es un microbicida débil. Estos compuestos se utilizan como materiales de partida para la producción de los oxidantes microbicidas. Estos se dividen en dos clases: los halógenos oxidados y los radicales libres. La producción del primero comienza con la oxidación del ion cloro (Cl^-) a hipoclorito (OCl^-) catalizada por la enzima mieloperoxidasa a expensas del H_2O_2 .	$Cl^- + H_2O_2 \rightarrow OCl^- + H_2O$
El OCl^- es un agente microbicida extremadamente poderoso. También es el precursor de las cloraminas, un grupo de halógenos oxidados microbicidas que se forman por la reacción entre el OCl^- y el amoníaco (NH_3) o las aminas (RNH_2).	$OCl^- + RNH_2 \rightarrow RNH_2Cl + HO^-$
Las especies reactivas de oxígeno se forman en reacciones que involucran $O_2^{\bullet-}$. La formación del radical hidroxilo ($\bullet OH$), se ha identificado como el producto más reactivo de todos. Esta reacción ocurre mediante la catálisis por un metal (hierro, Fe, o cobre, Cu) de la reacción entre $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 .	$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow \bullet OH + OH^- + O_2$

Abreviaturas: O_2 , oxígeno; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; $O_2^{\bullet-}$, radical superóxido; H^+ , catión hidrógeno; H_2O_2 , peróxido de hidrogeno; Cl^- , ion cloro; OCl^- , hipoclorito; RNH_2 , amina; RNH_2Cl , cloramina; HO^- , anión hidróxido; $\bullet OH$, radical hidroxilo.

De esta idea nace el concepto de “One Health” al reconocer que la salud humana está intrínsecamente relacionada con la salud de los animales, plantas y los ecosistemas (44). El término “One Health” se adoptó del concepto “One Health, One World™” (Centers for Disease Control and Prevention) presentado durante el simposio de la Sociedad de Conservación de la Vida Silvestre en 2004 (45) donde se exigieron enfoques interdisciplinarios e internacionales para la prevención de las enfermedades y la promoción de la salud.

El vínculo entre la población humana y animal con el medio ambiente circundante es especialmente estrecho en las regiones en desarrollo donde los animales proporcionan transporte, fuerza de tiro, combustible, ropa y alimento. La sanidad animal es necesaria para una producción ganadera sostenible. Los productos de origen animal no sólo representan una fuente de alimentos de calidad sino que son, también, una fuente de ingresos para pequeños agricultores y criadores de ganado en países en desarrollo, como México (46).

Para controlar la propagación de patógenos, se recomienda diseñar estrategias de monitoreo. El monitoreo es un proceso en el que se incluye la colección sistemática de información, su análisis y, con base en ello, la generación de conocimiento (47). Para el monitoreo adecuado de animales se sugiere la recopilación y seguimiento de datos cuantitativos y cualitativos que pueden incluir información sobre el comportamiento, estado físico, análisis bioquímicos y hallazgos clínicos. La colecta y análisis de muestras biológicas permite el monitoreo de condiciones fisiológicas, nutricionales o patológicas en animales silvestres y en cautiverio, y puede ser de ayuda para confirmar la presencia de agentes causantes de enfermedades infecciosas (48). Monitorear la salud de los animales y la prevención de brotes de enfermedades son vitales para la economía y la seguridad del suministro de alimentos del país. La producción de ganado sano ayuda a garantizar un suministro de alimentos seguros y a mantener estables los precios al consumidor (41).

El punto de partida para la identificación de enfermedades en animales está en la adecuada colecta de muestras. Los laboratorios de diagnóstico requieren que las muestras lleguen en buenas condiciones. Para lograr esto, las muestras deben tomarse con cuidado para evitar estrés o lesiones indebidas al animal o peligro para el operador (49). Las muestras se deben coleccionar asépticamente y se debe tener cuidado para evitar la contaminación cruzada entre muestras (49).

Cuando se toman muestras de animales vivos se debe tener cuidado para evitar lesiones en el animal o peligro para el operador. Puede ser necesario usar restricción mecánica, sedantes o anestesia. El muestreo en animales vivos incluye sangre, excreciones (heces y orina), piel, pelo, fluidos de tracto genital y semen, descarga nasal (saliva, lágrimas) y leche (49). Las colectas post-mortem deben llevarse a cabo en condiciones tan asépticas como sea posible. Se debe tener cuidado para evitar la contaminación ambiental o el riesgo de propagación de la enfermedad a través de insectos o fómites. La eliminación de animales y tejidos debe ser adecuada y segura (49).

Con frecuencia, las muestras de sangre son las más utilizadas para hematología, cultivo o identificación directa de patógenos; en estos casos es habitual el uso de anticoagulantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o la heparina. La serología requiere suero que se obtiene de una muestra coagulada. El plasma sanguíneo también puede utilizarse para algunos procedimientos.

La muestra usualmente se obtiene mediante punción venosa. En la mayoría de los mamíferos grandes, se selecciona la vena yugular o una vena caudal, pero también pueden utilizarse las venas braquiales y mamarias. La sangre se toma con una jeringa o con una aguja de doble punta y un tubo al vacío. Idealmente, la piel en el sitio de punción primero debe afeitarse o desplumarse y limpiarse con alcohol al 70%. Para las muestras que se colectan con anticoagulante, es necesario mezclar bien, usando agitación suave tan pronto como se haya tomado la muestra. Para las muestras de suero, la sangre debe dejarse reposar a temperatura ambiente (pero protegida del calor o frío excesivo) durante 1 a 2 horas hasta que el coágulo comience a contraerse. Después de varias horas, la muestra se puede centrifugar a $1000 \times g$ durante 10 a 15 minutos y el suero se puede decantar o separar con una pipeta.

Las muestras de leche se deben tomar después de limpiar y secar la punta del pezón, evitando el uso de antisépticos. El flujo inicial de leche debe desecharse y posteriormente tomar la muestra para realizar los análisis. La leche para pruebas serológicas no debe haberse congelado,

calentado ni sometido a sacudidas violentas. En caso de haber una demora se puede agregar conservantes a las muestras de leche.

Las muestras deben ser cuidadosamente empaquetadas, etiquetadas y enviadas al laboratorio por el método más rápido posible, con control de temperatura adecuado y los requisitos específicos requeridos para los análisis que se vayan a realizar. Si pueden llegar al sitio donde serán analizadas dentro de un período de 48 horas, las muestras deben enviarse refrigeradas.

Todas las muestras deben ir acompañadas de una carta que incluya el nombre y dirección del remitente, origen del material, información relevante, identificación del animal y muestras correspondientes, así como las pruebas solicitadas (49). Las muestras pueden almacenarse para uso periódico o para mantenerse a largo plazo; estas funciones deben separarse. Las condiciones de almacenamiento deben minimizar la pérdida de propiedades inmunológicas y bioquímicas de las muestras. Para ello se pueden utilizar tres métodos; congelación profunda, liofilización y almacenamiento en seco en papel filtro a temperatura ambiente.

Para el almacenamiento a largo plazo, la congelación profunda debe mantener una temperatura inferior a -60°C ; sin embargo, las temperaturas más bajas son más costosas de mantener. La mayoría de los laboratorios utiliza congeladores a -20°C pero el suero puede deteriorarse, especialmente si se almacena durante largos periodos de tiempo a esta temperatura. Los congeladores deben de tener sistemas de advertencia si la temperatura aumenta, así como generadores de reserva en caso de que ocurra una falla mecánica o de energía. La liofilización es generalmente considerada como el mejor método para el almacenamiento a largo plazo, ya que puede minimizar la pérdida de características de la muestra. Sin embargo, este proceso requiere mucho tiempo y el uso de equipo costoso.

El papel filtro es un papel semipermeable de celulosa o fibra de vidrio que puede ser un método alternativo, simple y económico, para almacenar muestras biológicas. Este método consiste en colocar una gota del fluido en papel filtro, el cual se seca a temperatura ambiente y así, la muestra puede conservarse sin necesidad de refrigeración. Las gotas de sangre seca (DBS, por sus siglas en inglés) requieren una pequeña cantidad de muestra por lo que funcionan como alternativa a la venopunción (50). El uso de DBS está documentado (50–52) y ha sido validado

para analitos como hormonas, anticuerpos, fármacos y proteínas. Algunos inconvenientes de usar DBS es el volumen de sangre total que se aplica al papel filtro. La variación en el tamaño de la gota de sangre se puede minimizar recolectando muestras en tiras de papel filtro como guía para estandarizar el volumen de muestra recolectado de cada individuo.

Como alternativa, para estandarizar la colecta de fluidos biológicos en papel filtro, Nobuto (53) utilizó tiras de papel filtro de celulosa de alta pureza para identificar toxoplasmosis en humanos, perros y gatos. Esta tira de papel consta de una sección de 5 x 30 mm para la zona de adsorción y una sección de 10 x 18 mm para el soporte durante la colecta y secado. El uso de la tira de papel filtro de Nobuto para la colecta de muestras de sangre simplifica el manejo, el procesamiento y el almacenamiento para su posterior análisis.

Esta técnica para la colecta de sangre ofrece como ventajas que el personal no requiere capacitación para la toma de la muestra, se pueden manejar volúmenes de sangre reducidos ($\sim 100 \mu\text{L}$), y permite coleccionar muestras, tanto de animales vivos como muertos (54). Otras ventajas del uso del papel filtro de Nobuto sobre los métodos convencionales son eliminar problemas con los tubos de colecta, reducir el tiempo de procesamiento y la mano de obra en el campo, y que no se requieren equipos especializados, que pueden ser difíciles de transportar, operar y mantener en el campo (55). La durabilidad del papel filtro en comparación con los tubos de vidrio o plástico y su peso liviano facilitan la colecta, almacenamiento y transporte de muestras. Este método también puede ayudar a responder a la necesidad de ampliar, refinar e integrar la vigilancia de las enfermedades en animales de vida silvestre con los sistemas de salud pública (56, 57).

2. ANTECEDENTES

La idea de usar el papel filtro de celulosa para la colecta de muestras biológicas fue desarrollada por Ivar Christian Bang. En 1913, Bang determinó concentraciones de glucosa a partir de eluatos de DBS (58). Posteriormente, diversos autores reportaron el uso de DBS para pruebas serológicas. Chapman, en 1924, destacó 4 grandes ventajas del uso del papel filtro en comparación de metodos convencionales, como la venopunción (Tabla 3) (59).

Tabla 3. Comparación de métodos de colecta de sangre completa en el muestreo de animales vivos.

	Venopunción	Papel filtro
Colecta	Requiere de la punción de venas perifericas mediante sistema de llenado al vacío	No invasiva ya que se pueden utilizar venas marginales para obtener una gota de sangre
Volumen	6 a 10 mL	Menor a 1 mL
Alteraciones	Coagulación, hemólisis, deterioro por temperatura o tiempo	Riesgo de contaminación bacteriana o hemolisis mínimo
Preservación	Deben mantenerse alejados de la luz y calor. No debe ser sometidos a movimientos bruscos	Puede almacenarse por largos periodos de tiempo a temperatura ambiente

La estabilidad del material biológico en la matriz de papel filtro se atribuyó a que el proceso de secado excluye el agua, factor importante necesario para que actúen enzimas proteolíticas en la degradación de proteínas.

Fue en 1963, 50 años después de la publicación de Bang, que Robert Guthrie y Ada Susi, utilizaron este planteamiento a gran escala para el diagnóstico de enfermedades metabólicas en poblaciones de recién nacidos (60). En este estudio la determinación de fenilcetonuria fue validada por medio de espectrofotometría enzimática (61). Las muestras de sangre de recién nacidos se obtuvieron por punción capilar de talón, la cual se depositó en pequeños discos de papel filtro de 0.25 pulgadas de diámetro (Schleicher & Schuell #903). Aunque el muestreo en papel filtro (DBS) se ha utilizado para análisis biológicos y clínicos de muestras biológicas desde mediados de la década de 1960, ha demostrado ser un desafío (60). Las DBS se consideraron un método comúnmente aplicable para la colecta, almacenamiento, transporte y análisis de una gran variedad de fluidos humanos; sin embargo, su uso en aplicaciones veterinarias aún no ha sido explorado por completo.

En 1967, Kenzo Nobuto propuso el uso del papel filtro de celulosa en forma de tiras (Fig. 1) para la colecta de muestras de sangre (53). En dicho estudio, la sangre del corazón de perros, gatos y humanos se absorbió en tiras de papel filtro (Toyokagaku No. 1) para después secarse a temperatura ambiente durante 4 días (53). Para eluir el anticuerpo, el área de adsorción se cortó y sumergió en 0.6 mL de PBS por 1 hora a temperatura ambiente, y por medio de ensayos de hemaglutinación detectaron anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* a diferentes diluciones (1:64, 1:256, 1:1024) en el papel filtro de Nobuto (53). Otros análisis confirmaron que la concentración del anticuerpo en el eluato era equivalente al del suero diluido a 1:16 (53).

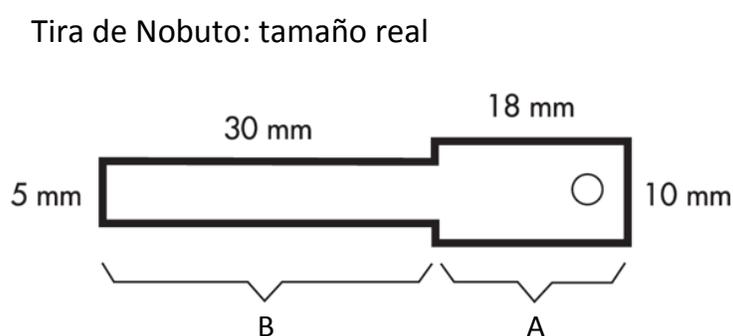


Figura 1. Tira de papel filtro de Nobuto compuesta de (A) área de difusión (10 x 20 mm) y de (B) área de adsorción de la muestra (5 x 30 mm).

Según especificaciones del fabricante (ADVANTEC®) el papel para muestreo de sangre (filtro de Nobuto) colecta sangre en el área de adsorción de la tira (B) y se deja secar en el área de difusión (A) para un manejo fácil y eficiente de las muestras. La tira adsorbe aproximadamente 0.1 mL de sangre o 0.04 mL de suero. El papel filtro para la colecta de muestras está fabricado con fibras de algodón de alta calidad, que han sido tratadas para lograr un alto contenido de alfa celulosa (>98%) para garantizar calidad, reproducibilidad y uniformidad en la toma de muestra (62).

El papel de celulosa de alta pureza produce una fina estructura similar a un tejido, ideal para un muestreo uniforme. Una vez secas las muestras se pueden analizar, almacenar o transportar sin refrigeración. La celulosa es un polímero formado por una larga cadena de moléculas de glucosa unidas por puentes de oxígeno con un alto grado de polimerización y cristalinidad. La cristalinidad indica que las moléculas de fibra están muy juntas y son paralelas entre sí. El tamaño de poro de retención se puede ajustar según el analito, por esta razón el papel a base

de celulosa es ideal para usarse en ensayos biológicos y clínicos.

Los materiales a base de celulosa, como el papel filtro, son compatibles con muestras biológicas, pueden modificarse químicamente para incorporar grupos funcionales y son un buen medio para ensayos colorimétricos, ya que proporcionan un fondo blanco. La química y la porosidad de la superficie influyen en la inmovilización de biomoléculas (por ejemplo, anticuerpos y oligonucleótidos), así como la absorción de fluidos.

La validación del papel filtro utilizado por Nobuto abrió las puertas para que diversos autores utilizaran este método para la colecta masiva de muestras de animales silvestres y domésticos. En 1985, Avakian y Dick (63) midieron la actividad de los anticuerpos contra *Pasteurella multocida* en gallinas leghorn comparando los dos métodos para obtener muestras de sangre. Se tomaron muestras de sangre entera en tiras de papel de filtro (#740-E, Schleicher y Schuell, Inc., Keene, New Hampshire), se secaron a temperatura ambiente durante 48 horas y se almacenaron a 4°C en bolsas plásticas selladas. Siguiendo el método común, utilizando jeringas y agujas, se obtuvo el estándar de referencia. Se separó el suero de los glóbulos rojos y se almacenó a -20°C hasta su análisis. La sangre se extrajo del papel filtro cortando dos discos de 4.8 mm de diámetro para después sumergirse durante la noche a 4°C en 200 µL de solución salina. Mediante un ELISA se comparó la actividad de los anticuerpos presentes en las tiras de papel filtro y los presentes en el suero; la dilución de las muestras de sangre presentes en los discos fue considerada 1:20. Los resultados obtenidos en las muestras colectadas en las tiras de papel filtro no mostraron diferencias significativas con los resultados en las muestras tomadas de la misma ave ($p < 0.05$).

En 2011, Dusek et al. evaluaron la utilidad de las tiras de papel filtro de Nobuto para la detección de anticuerpos contra la influenza aviar en patos reales (*Anas platyrhynchos*) en muestras de suero y sangre entera absorbida en tiras de papel filtro de Nobuto. Mediante un c-ELISA se obtuvieron resultados comparables (sensibilidad $\geq 96\%$) entre los sueros almacenados a -30°C y el método de preservación en las tiras de Nobuto almacenadas hasta 3 meses a temperatura ambiente (64).

El mismo año, Curry et al. analizaron muestras de sangre colectada con tiras de papel filtro de Nobuto de caribúes (*Rangifer tarandus groenlandicus*) para detectar anticuerpos de *Brucella*

spp. Las muestras de suero (estándar de referencia) y las tiras de papel filtro saturadas con sangre se analizaron simultáneamente usando un c-ELISA y un i-ELISA. En los resultados del c-ELISA las muestras de papel filtro tuvieron prevalencia de 47% de *Brucella spp.* contra 52% de prevalencia en el suero, este análisis mostró sensibilidad del 89% y especificidad del 99%. Para el i-ELISA la prevalencia de *Brucella spp.* en ambas muestras fueron idénticas (43%); la sensibilidad fue del 100% y la especificidad del 99%. A pesar de que el i-ELISA no distingue entre anticuerpos de reacción cruzada inducidos por vacunación o exposición a otros patógenos Gram-negativos, ambos análisis sugieren que el almacenamiento de muestras en tiras de papel filtro de Nobuto hasta 2 meses a temperatura ambiente es factible para identificar este patógeno en *R. tarandus groenlandicus* (55).

En 2014, Curry et al. compararon el rendimiento del papel filtro de Nobuto contra muestras de suero como estándar de referencia, para detectar anticuerpos de patógenos en renos en cautiverio (*R. tarandus tarandus*). Por medio de c-ELISA se detectó *Neospora caninum* y el virus del Nilo Occidental (familia Flaviviridae) con una especificidad del 92%. Con i-ELISA la especificidad aumentó hasta un 98% para el virus de la parainfluenza tipo 3 y el virus respiratorio sincitial bovino (65).

Hansen et al. en 2014 validaron el uso de papel filtro de celulosa para cuantificar concentraciones de mercurio total [THg] por medio de un analizador directo de mercurio (Milestone DMA-80) en sangre de delfines nariz de botella (o tursiones, *Tursiops truncatus*) y en focas de puerto (*Phoca vitulina*) silvestres que fueron capturados para rehabilitación en el Centro de Mamíferos Marinos en California, USA (66). La [THg] en papel filtro seco empapado con sangre, en papel filtro después de la elución, y en eluatos de papel filtro se compararon contra [THg] de la sangre total, como estándar de referencia. El valor de p en relación con el estándar de referencia fue de 0.89 ± 0.15 , 0.86 ± 0.13 y 0.96 ± 0.23 , respectivamente, sugiriendo que no existe diferencia estadística entre los métodos propuestos y el estándar de referencia (66).

A pesar de que la eficacia de la inmovilización de antígenos sobre las fibras de celulosa en sangre ha sido validada por diversos autores, todavía se necesita optimización para que otros analitos y tipos de muestras sean validados.

3. JUSTIFICACIÓN

Diseñar e implementar sistemas de vigilancia de enfermedades en animales puede ser un gran reto ya que, debido al aislamiento, falta de infraestructura, escasez de servicios sanitarios y de laboratorios calificados que garanticen un diagnóstico exacto en comunidades rurales, es difícil identificar, diagnosticar y notificar enfermedades. El método de muestreo en animales suele ser uno de los principales factores que afecta de manera directa la calidad de la muestra y, por lo tanto, su resultado. Por ello, implementar sistemas adecuados para la preservación de las muestras desde el sitio de colecta hasta el laboratorio donde se llevará a cabo el análisis es de gran importancia. El uso del papel filtro de Nobuto para la colecta, transporte y almacenamiento de muestras biológicas podría ofrecer una alternativa para garantizar la integridad de las muestras. Si bien el uso del papel filtro ha sido probado y validado para el análisis de patógenos específicos, así como para la cuantificación de la concentración de metales pesados en muestras de sangre, no se conocen aún las limitaciones para su aplicación en otras técnicas y otras matrices biológicas. En este estudio se probó el uso del papel filtro de Nobuto, en comparación con técnicas convencionales de colecta y almacenamiento, para detectar patógenos e indicadores de estrés oxidativo en muestras de sangre y leche de ganado.

4. HIPÓTESIS

Si el uso del papel filtro de Nobuto es capaz de mantener la composición e integridad de muestras biológicas, entonces es un método factible para la colecta, transporte y almacenamiento de muestras biológicas en la evaluación y cuantificación de indicadores de salud en lugar de los métodos convencionales.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Validar el uso del papel filtro de Nobuto para la colecta de muestras de sangre y leche de ganado bovino y caprino para la evaluación y cuantificación de indicadores de salud en ganado de la región de Todos Santos, Baja California Sur, México.

5.2. Objetivos particulares

5.2.1. Objetivo particular 1

Colectar muestras de sangre y leche de ganado bovino y caprino de la región de Todos Santos, Baja California Sur, México con los métodos convencionales y con las tiras de papel filtro de Nobuto.

5.2.2. Objetivo particular 2

Utilizar las muestras de fluidos biológicos (sangre y leche) de ganado bovino y caprino colectados con los métodos convencionales y con las tiras de papel filtro de Nobuto para identificar la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* y *Anaplasma spp.*

5.2.3. Objetivo particular 3

Utilizar las muestras de fluidos biológicos (sangre y leche) de ganado bovino y caprino colectados con los métodos convencionales y con las tiras de papel filtro de Nobuto para cuantificar la concentración de glutatión, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y carbonilos proteicos como indicadores de estrés oxidativo.

5.2.4. Objetivo particular 4

Analizar y comparar los resultados obtenidos en las muestras colectadas con papel filtro de Nobuto contra aquellas colectadas con el método tradicional.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

Los muestreos se llevaron a cabo en tres ranchos ubicados en la delegación de Todos Santos (23°26' N y 110°14' W), municipio de La Paz, Baja California Sur (Fig. 2). Esta zona se caracteriza por tener un clima semicálido con una precipitación anual promedio de 160 mm y temperatura media anual de 21.9°C (67).

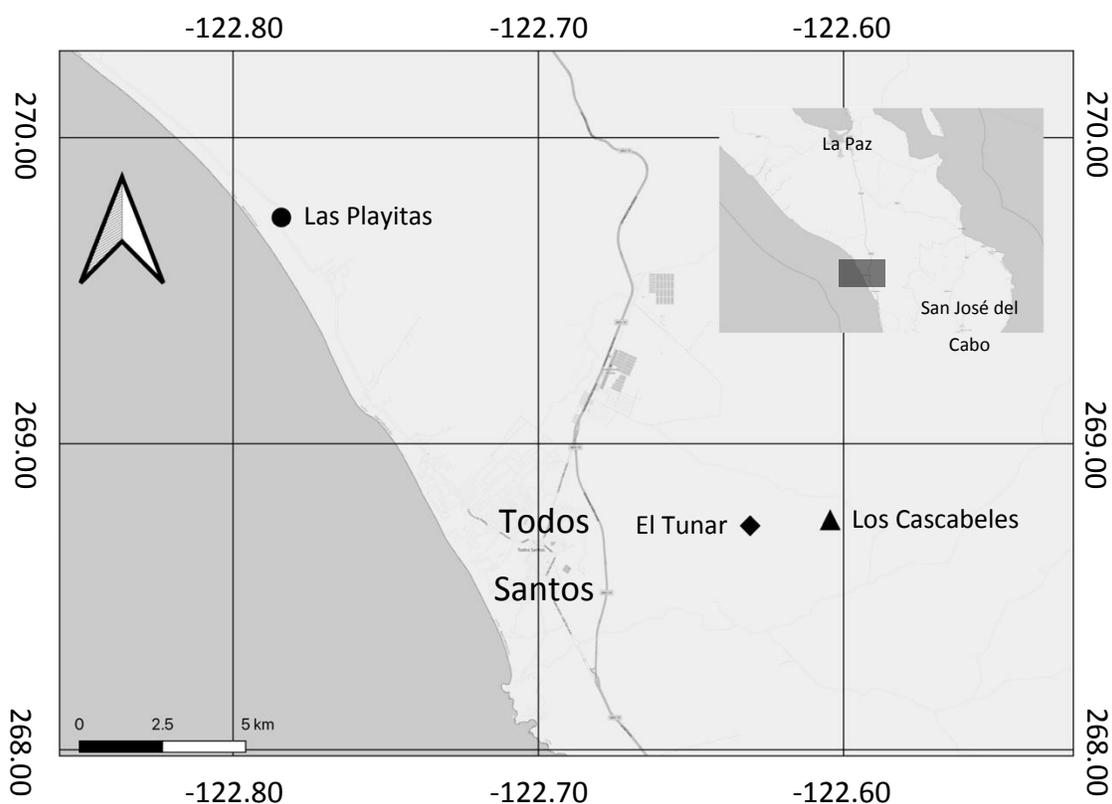


Figura 2. Ubicación de los ranchos en Todos Santos, Baja California Sur, México en donde se colectaron muestras de sangre y leche de ganado. Las Playitas (23° 32' 21.8" N, 110° 17' 51.91" W), Los Cascabeles (23° 27' 41.52" N, 110° 10' 0.4" W) y El Tunar (23° 27' 49.87" N, 110° 7' 54.01" W).

6.2. Toma de muestra

6.2.1. Estándar de referencia

Se colectaron muestras de sangre y leche de bovinos ($n = 11$) y caprinos ($n = 26$) entre febrero y agosto de 2019. Las muestras de sangre se obtuvieron por medio de punción venosa coccígea o yugular en tubos Vacutainer® de 10 mL con heparina de sodio como anticoagulante. Las

muestras de leche se obtuvieron por ordeña manual en tubos estériles de plástico de 15 mL. Los tubos fueron etiquetados para ser colocados sobre hielo y transportados al laboratorio de enseñanza del centro educativo de la Universidad Estatal de Colorado, en Todos Santos, Baja California Sur.

6.2.2. Papel filtro de Nobuto

Las tiras de papel filtro de Nobuto[®] (Advantec, Dublin, California, USA) se obtuvieron como donativo de la Universidad de Alaska Fairbanks. El papel filtro de Nobuto se utilizó en grupos de 5 tiras, las cuales fueron sumergidas en cada muestra de sangre y leche previamente obtenidas, hasta saturarse por completo (~100 μ L); por cada muestra se utilizaron tres grupos de cinco tiras (15 tiras en total) de papel filtro de Nobuto. Las tiras se secaron al aire a temperatura ambiente y, una vez secas, se almacenaron en las mismas condiciones, en sobres de papel hasta su análisis (55).

6.3. Procesamiento de muestras

6.3.1. Estándar de referencia

Como estándares de referencia se utilizaron sangre total para la cuantificación de los indicadores de estrés oxidativo, plasma para la identificación de microorganismos, y leche para ambos análisis. De cada tubo Vacutainer[®] con heparina de sodio se tomaron alícuotas de 1 mL de sangre total en crioviales de 2 mL. Para obtener el plasma, el remanente se centrifugó por 10 minutos a $890 \times g$ para separarlo de los glóbulos blancos y los eritrocitos. Se recuperaron alícuotas de 1 mL de plasma en crioviales de 2 mL. De los tubos con leche se tomaron alícuotas homogéneas de 1 mL sin tratamiento previo en crioviales de 2 mL. Todos los crioviales se identificaron con una clave única para cada animal y se llevaron a congelación (-20°C) durante 4 meses, hasta su análisis.

6.3.2. Papel filtro de Nobuto

Previo al análisis de muestras se eluyó el material que se absorbió a las tiras de papel filtro de Nobuto de acuerdo al método descrito por Curry et al. (55). Se preparó una solución de trabajo que contenía solución salina amortiguada con fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés), carbonato

de calcio (CaCl), cloruro de magnesio (MgCl) y una mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomicina) al 1%. Cada tira, cortada en 5 a 6 piezas utilizando tijeras estériles, se colocó en un criovial de 2 mL para luego añadir 400 μ L de solución de trabajo. Los tubos se agitaron por 1 minuto utilizando un vortex para asegurar que cada segmento se cubriera completamente con la solución y se dejó eluir durante toda la noche (~16 horas) a 4°C. De cada criovial que contenía una tira de papel filtro se obtuvieron 400 μ L de eluato, el cual fue transferido a tubos de microcentrífuga Eppendorf® de 1.5 mL (55).

6.4. Análisis serológicos

6.4.1. *Brucella abortus*

Para identificar anticuerpos contra *Brucella abortus*, las muestras se analizaron en el laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad Estatal de Colorado, Estados Unidos, mediante una CAT. El CAT es una prueba rápida de serología, la cual emplea un antígeno preparado a partir de una suspensión celular concentrada de una cepa de *B. abortus* que es aglutinado directamente por los anticuerpos de una muestra de suero o plasma. La prueba se lee después de 4 minutos de incubación; se interpreta como positiva cuando se observan grupos de antígeno aglutinado separados por un líquido transparente, o como negativa cuando no hay signos de aglutinación (68). Al ser un método cualitativo, todos los resultados positivos para *B. abortus* se confirman con pruebas adicionales; para ello, las muestras en las que se obtuvo resultado positivo se analizaron en el laboratorio de Salud Animal del Departamento de Agricultura en Colorado, Estados Unidos por medio de un ensayo de polarización de fluorescencia (FPA, por sus siglas en inglés) para evaluar la presencia de anticuerpos contra *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*. El FPA se basa en las diferencias de rotación entre una molécula pequeña de antígeno soluble marcado con un fluorocromo y su anticuerpo. La velocidad de rotación dependerá del tamaño y estructura molecular; el cambio en la tasa de despolarización se midió evaluando el tiempo que lleva a las moléculas rotar a través de un ángulo de aproximadamente 68.5° (69). El resultado se expresó en unidades de milipolarización (mP).

6.4.2. *Anaplasma spp.*

La presencia de *Anaplasma spp.* se analizó en el laboratorio de Salud Animal del Departamento de Agricultura en Colorado, Estados Unidos, por medio de un c-ELISA. Este ensayo detecta

específicamente la presencia de anticuerpos monoclonales (MAb) que se dirigen a la proteína principal de superficie 5 (MSP5) expresada por todas las especies del género *Anaplasma*. La precisión de la prueba depende del valor del punto de corte utilizado para clasificar las muestras como infectadas o no. Con un punto de corte del 30%, este método se considera sensible (95%) y específico (98%) para la detección de animales infectados con *Anaplasma spp.* (29, 70, 71). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición (% I); si éste fue mayor o igual al 30%, se interpretó como muestra positiva.

6.5. Indicadores de estrés oxidativo

6.5.1. Glutación

Para cuantificar la concentración de glutación se utilizó el método de Griffith (1980) con las modificaciones descritas por Hermes-Lima y Storey (1998). Este método se basa en la reacción de glutación con ácido 5,5'-ditiobis-2(2-nitrobenzoico) (DTNB). Las muestras se homogenizaron en ácido sulfosalicílico (5%). Posteriormente, fueron burbujeadas con nitrógeno gaseoso (N_2) por 10 segundos, y centrifugadas por 10 minutos a $17,004.8 \times g$ a $4^\circ C$. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en tubos Eppendorf[®], mismos que fueron colocados en hielo. Para determinar la concentración de glutación total (GSH-Eq), a la mitad de los tubos se les agregó solución amortiguadora de fosfatos (KPI, 500 mM). A la segunda mitad, además de la solución KPI se les adicionó 2-vinilpiridina (0.05 M) y se incubaron en la oscuridad por 1 hora para determinar la concentración de glutación oxidado (GSSG). En una microplaca se agregó la muestra, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, 0.3 mM), DTNB (6 mM) y glutación reductasa (GR, 50 U mL^{-1}) para, posteriormente, registrar la absorbancia a 412 nm durante 130 segundos en un lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific). Para calcular la concentración de GSH-Eq y GSSG se utilizaron curvas estándar con concentraciones conocidas en un rango de 0 a $2.5 \mu\text{mol mL}^{-1}$. La concentración del glutación reducido (GSH) se calculó con la fórmula $\text{GSH-Eq} = \text{GSH} + 2(\text{GSSG})$. Los resultados se expresaron en nanomoles por miligramo de hemoglobina (Hb) o nanomoles por miligramo de proteínas totales. Se calculó la tasa GSSG:GSH como un indicador del estado redox del glutación, mismo que puede tomarse como indicador de daño oxidativo.

6.5.2. Daño oxidativo a proteínas

El daño oxidativo a proteínas se cuantificó como el contenido de carbonilos proteicos formados a partir de reacciones en las que interactúan aldehídos procedentes de la peroxidación de lípidos o de la oxidación de carbohidratos con proteínas (74,75). Se midió la formación de un complejo entre los derivados carbonilados de las proteínas y la 2,4-dinitrofenil hidracina (DNPH). Para el análisis, se tomaron 100 μL de muestra y se homogenizaron con ácido sulfosalicílico al 5%. El líquido homogenizado se centrifugó a $2515 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se agregó DNPH (10 mM) a las muestras y ácido clorhídrico (HCl, 2 M) a los blancos y se incubó por 1 hora. Se añadió ácido tricloroacético (TCA, 20%) para después centrifugar a $2515 \times g$ por 10 minutos a 4°C ; se decantó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con etanol-acetato de etilo (1:1) centrifugando después de cada lavado a $2515 \times g$ por 10 minutos a 4°C . A continuación, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con clorato de guanidina (6 M) para desnaturalizar las proteínas. Se incubaron los tubos por 15 minutos a 37°C y se centrifugaron a $2515 \times g$ por 10 minutos. El sobrenadante se recuperó para ser transferido a una microplaca de plástico; se leyó la absorbancia en un lector de microplaca con barrido en el rango de 340 a 410 nm. Se registró la absorbancia máxima y se determinó la concentración de carbonilos proteicos utilizando el coeficiente de extinción de 22 mmol L^{-1} . Los resultados se expresaron en nanomoles de carbonilos proteicos por miligramo de proteínas totales o en nanomoles de carbonilos proteicos por miligramo de Hb.

6.5.3. Daño oxidativo a lípidos

La concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se midió como indicador de la peroxidación de lípidos mediante la cuantificación de la concentración de malondialdehído (MDA) (76). El MDA es un pigmento rosa cristalino que se forma cuando los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos, producto de la lipoperoxidación, reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y se registra la absorbancia a 532 nm. Para la cuantificación de TBARS, se preparó una curva estándar con 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) en un rango de 0 a 5 mmoles $250 \mu\text{L}^{-1}$. Los tubos con la curva estándar y la muestra se incubaron a 37°C con agitación constante durante 15 min. Para detener la reacción, todos los tubos se colocaron en baño de hielo e inmediatamente se les agregó TCA (12.5%). Posteriormente se añadió TBA (1%) y se incubaron a 90°C con agitación durante 10 minutos. Por último, los tubos se enfriaron en baño

de hielo y se centrifugaron a $905.6 \times g$ por 10 min a 4°C . Se recuperó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 532 nm en un lector de microplaca. Los niveles de TBARS en las muestras se obtuvieron a partir de la curva estándar, expresando los resultados en nanomoles de TBARS por miligramo de proteínas totales o en nanomoles de TBARS por miligramo de Hb.

6.5.4. Determinación de proteínas totales

Se cuantificó la concentración total de proteínas solubles en las muestras utilizando el método descrito por Bradford (1976) adaptado a microplaca. Se usó un kit comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Se leyó la absorbancia a 590 nm (MicroLab 300, Vital Scientific, Países Bajos). Los resultados se expresaron en miligramos de proteína por mililitro.

6.5.5. Determinación de hemoglobina total

La concentración total de hemoglobina (Hb) se cuantificó por medio de un ensayo colorimétrico comercial (Cayman Chemical, Item No.700540), el cual utiliza un reactivo de detección selectivo para el grupo hemo que crea un producto que absorbe entre 560 y 590 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración total de Hb en la muestra. Se registró la absorbancia en las muestras usando un lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific). La concentración de Hb en cada muestra se obtuvo a partir de una curva estándar, la cual tenía concentraciones entre 0 y $0.4 \text{ nmol Hb mL}^{-1}$. Los resultados se expresan en nanomoles de Hb por mililitro.

6.6. Cálculos y análisis estadísticos

6.6.1. Factor de corrección

Se aplicó un factor de corrección a los datos de los eluatos obtenidos del papel filtro de Nobuto (E) para estimar los valores reales de las variables cuantificadas (66). En el proceso de elución se utilizaron $400 \mu\text{L}$ de PBS ($\sim 400 \text{ g}$) para sumergir las tiras de papel filtro de Nobuto que contenían componentes secos (CS); cada tira de papel filtro absorbe aproximadamente $100 \mu\text{L}$ ($\sim 100 \text{ g}$) de muestra. Para calcular el contenido de los CS se pesó la parte absorbente de las tiras antes (blanco) y después de absorber la muestra (empapado); para cada tira de papel filtro se utilizó la fórmula,

$$CS = \text{masa (g) papel filtro empapado} - \bar{x} \text{ de la masa (g) del papel filtro control} \quad (1)$$

El factor de corrección (FC) se estimó para cada muestra de la siguiente manera,

$$FC = \frac{\text{masa del eluato (0.4 g + CS)}}{\text{masa de la muestra (100 g)}} \quad (2)$$

Para que cada muestra fuera comparable con su estándar de referencia (ER), se multiplicó cada dato de las variables cuantificadas en los eluatos por el FC respectivo.

6.6.2. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas computacionales Excel e IBM[®] SPSS[®] Statistics. Previo a los análisis, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Dado que la mayoría de las variables presentaron normalidad ($p < 0.05$), se realizaron pruebas t de Student para muestras relacionadas para comparar los resultados obtenidos en los estándares de referencia con aquellos en las muestras colectadas en el papel filtro de Nobuto. El nivel de significancia estadística que se consideró en todos los análisis de este estudio fue de $p < 0.05$. Los datos que estuvieron por debajo del límite de detección (LD) de los análisis se sustituyeron utilizando la mitad del valor del límite de detección (i.e. LD/2) con el fin de completar la base de datos (78,79).

7. RESULTADOS

Se visitaron tres ranchos ganaderos de Todos Santos, Baja California Sur (Fig. 1), donde se obtuvieron muestras de 38 individuos. Se analizaron muestras de leche y sangre de un grupo de hembras criollas ($n = 38$), de las cuales 27 (71%) representaban a ganado caprino y 11 (29%) a ganado bovino. La edad promedio del grupo fue de 6 años (rango = 2 a 8 años), con al menos una gesta por individuo. De los 38 organismos, 13 (34%) estaban identificados y registrados por el Sistema Nacional de Identificación Individual de Ganado (SINIIGA). La identificación individual consistió en asignar a cada animal un arete con un número único de cuatro dígitos que lo acompaña a lo largo de su vida; éste permite al productor y a las autoridades sanitarias llevar un control del inventario y del estado zoonosanitario. Únicamente uno de los organismos muestreados tenía inflamación en las ubres (mastitis), mientras que el resto se encontraba aparentemente saludable, sin signos o síntomas de alguna enfermedad.

7.1. Análisis serológicos

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la CAT realizada a las muestras de plasma colectadas con los métodos tradicionales (estándar de referencia) de ganado bovino y caprino de Todos Santos, Baja California Sur, para identificar anticuerpos contra *B. abortus*. A aquellas muestras en las que se detectaron anticuerpos contra este patógeno se les realizó una prueba confirmatoria (Fig. 3). Los resultados de todas las muestras estuvieron por debajo de los límites para considerar muestras sospechosas (10 mP – 20 mP) o positivas (< 20 mP). Por lo tanto, no se evaluaron las muestras colectadas en papel filtro de Nobuto.

Tabla 4. Prueba de aglutinación en tarjeta para identificar anticuerpos contra *Brucella abortus* en plasma colectado con los métodos tradicionales (estándar de referencia) de ganado bovino y caprino ($n = 38$) de Todos Santos, Baja California Sur, México.

	Positivos	Negativos
Animales individuales	4	34

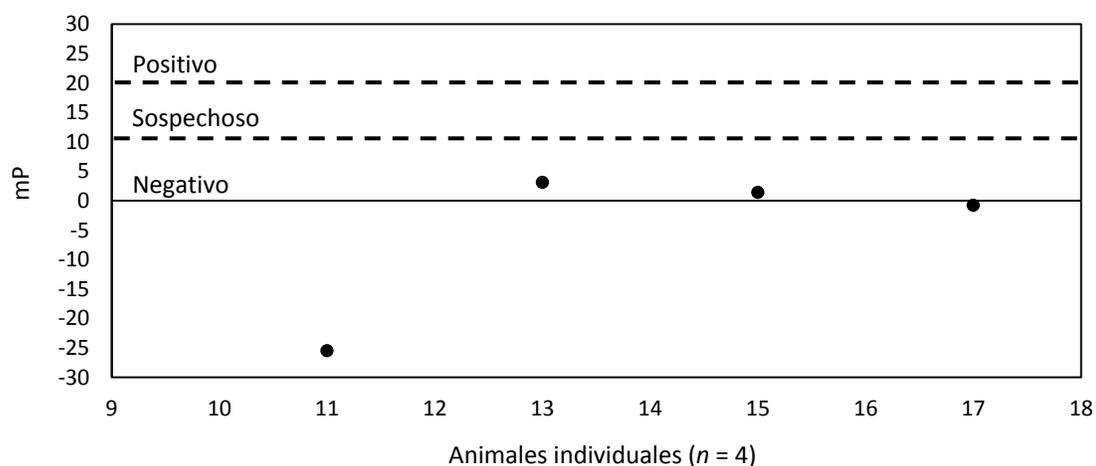


Figura 3. Ensayo de polarización de fluorescencia (mP) para identificar anticuerpos contra *Brucella spp.* en muestras de plasma colectado con los métodos tradicionales (estándar de referencia) de ganado bovino y caprino de Todos Santos, Baja California Sur, México.

En la figura 4 se presentan los resultados de c-ELISA para identificar anticuerpos de *Anaplasma spp.* en muestras de plasma colectadas con los métodos tradicionales (estándar de referencia) de ganado bovino y caprino. El valor de corte establecido por el Laboratorio de Salud Animal del Departamento de Agricultura en Colorado, Estados Unidos, es del 30% de inhibición de la reacción. Con estos parámetros, se encontró que el 100% de las muestras se ubicaron por debajo del punto de corte. Por lo tanto, no se analizaron las muestras colectadas en papel filtro de Nobuto.

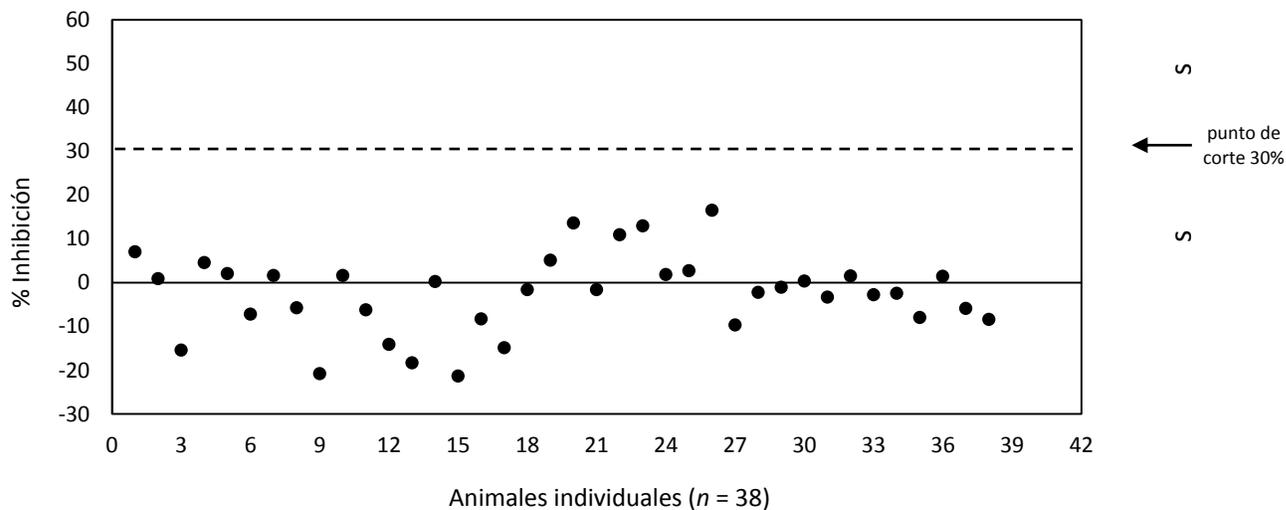


Figura 4. Ensayo de inmunoadsorción competitivo ligado a enzimas (c-ELISA) para identificar anticuerpos contra *Anaplasma spp.* en muestras de plasma colectado con los métodos tradicionales (estándar de referencia) de ganado bovino y caprino de Todos Santos, Baja California Sur, México.

7.2. Indicadores de estrés oxidativo

En la figura 5 se presenta la frecuencia absoluta de los indicadores de estrés oxidativo detectados en el papel filtro de Nobuto. Se detectaron las variables GSH-Eq, GSSG, proteínas totales (PT) y TBARS en más del 95% de las muestras de sangre. Las proteínas carboniladas (PC) se detectaron hasta en 76% de las muestras de sangre. Las variables GSH-Eq, GSSG, PT y TBARS se detectaron en 95% de las muestras de leche, y las PC se detectaron en 89% de las muestras de leche.

La comparación de concentraciones entre el estándar de referencia y las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto para los niveles de daño oxidativo y antioxidantes no enzimáticos cuantificados en sangre y leche de ganado bovino y caprino de Todos Santos, Baja California Sur, se presentan en la Tabla 5.

En las muestras de sangre se observó mayor concentración de GSH-Eq ($p < 0.01$), GSH ($p < 0.01$), GSSG ($p < 0.01$), TBARS ($p < 0.01$), PC ($p < 0.01$) y proteínas totales ($p = 0.01$) en las muestras colectadas en papel filtro de Nobuto en comparación con el estándar de referencia. No se

observaron diferencias significativas en la tasa de GSSG:GSH entre los métodos de colecta ($p = 0.233$).

En las muestras de leche se observó menor concentración de GSH-Eq ($p < 0.01$), GSH ($p < 0.01$), carbonilos proteicos ($p < 0.01$) y proteínas totales ($p = 0.026$), y mayores concentraciones de GSSG ($p < 0.01$) y TBARS ($p < 0.01$) en las muestras colectadas en papel filtro de Nobuto en comparación con el estándar de referencia. La tasa de GSSG:GSH fue mayor en las muestras colectadas en papel filtro de Nobuto en comparación con el estándar de referencia ($p < 0.01$).

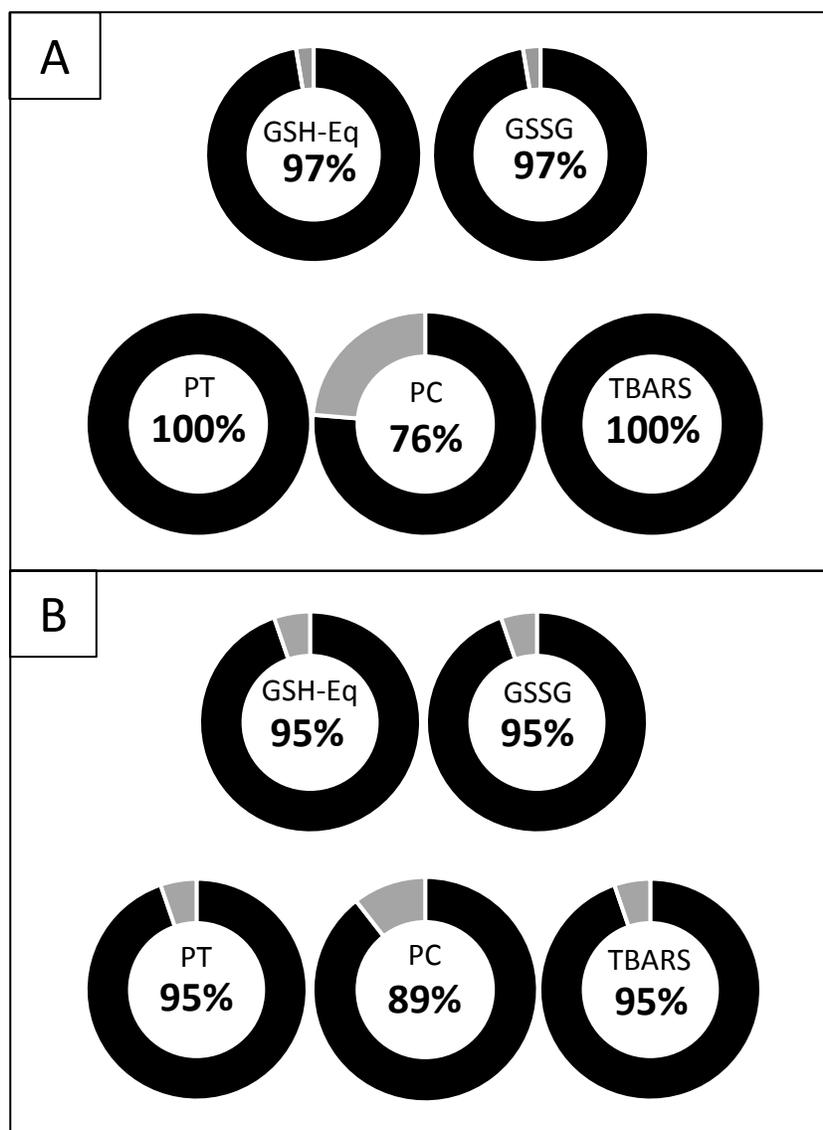


Figura 5. Frecuencia relativa de los indicadores de estrés oxidativo detectados en el papel filtro para las muestras de sangre (A) y leche (B) en relación con su estándar de referencia. Abreviaturas: GSH-Eq, glutatión total; GSSG, glutatión oxidado; PT, proteínas totales; TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúctico; PC, proteínas carboniladas.

7.2.1. Asociación entre el estándar de referencia y las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto

La asociación del estándar de referencia y las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto con correlación significativa se muestran en la figura 6. En las muestras de sangre, para las variables GSH-Eq ($p = 0.214$), GSH ($p = 0.289$), GSSG ($p = 0.293$), GSSG:GSH-Eq ($p = 0.512$), TBARS ($p = 0.488$), PC ($p = 0.765$) y proteínas totales ($p = 0.392$) no se encontró relación lineal entre la concentración del estándar de referencia y las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto. En las muestras de leche, se encontró una correlación lineal significativa en la concentración de proteínas totales en más del 50% de las muestras ($R = 0.571$) con un valor de $p < 0.01$ entre las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto y el estándar de referencia. Para las variables GSH-Eq ($p < 0.01$), GSH ($p = 0.275$), GSSG ($p = 0.015$), GSSG:GSH-Eq ($p = 0.268$), TBARS ($p = 0.269$) y PC ($p = 0.521$) no se encontró una relación lineal significativa entre la concentración del estándar de referencia y las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto.

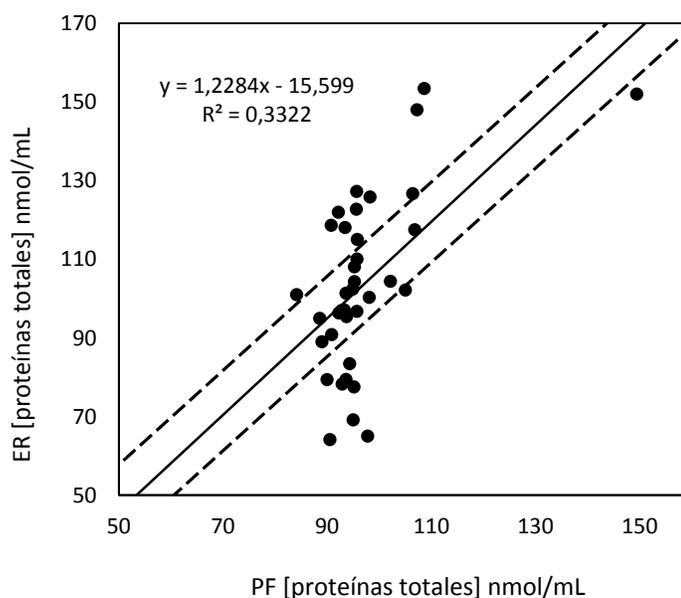


Figura 6. Relación lineal entre las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto (PF) y el estándar de referencia (ER) para la concentración de proteínas totales ([proteínas totales], nmol/mL) en muestras de leche de ganado colectadas en Todos Santos, Baja California Sur. Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza al 95%. A todos los datos de las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto se les aplicó un factor de corrección (ver sección Materiales y Métodos).

Tabla 5. Comparación de los indicadores de estrés oxidativo cuantificados en muestras de sangre y leche colectados por los métodos tradicionales (estándares de referencia) y en papel filtro de Nobuto de ganado bovino y caprino (n = 38) de Todos Santos, Baja California Sur.

	Sangre				Leche			
	Estándar de referencia Media (E.S.)	Papel filtro de Nobuto Media (E.S.)	Diferencia %	p	Estándar de referencia Media (E.S.)	Papel filtro de Nobuto Media (E.S.)	Diferencia %	p
GSH-Eq ^a ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína)	112.97 (16.4)	1,408.25 (348.61)	1146.4	< 0.01*	94.34 (20.77)	42.29 (3.66)	-55.16	< 0.01*
GSH ^b ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína)	25.03 (7.7)	334.43 (129.4)	1121.06	< 0.01*	79.40 (17.65)	2.62 (2.18)	-96.68	< 0.01*
GSSG ^a ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína)	43.97 (5.7)	536.91 (150.38)	1235.76	< 0.01*	7.46 (1.65)	19.83 (1.71)	165.59	< 0.01*
GSSG:GSH-Eq ^b	0.39 (0.02)	0.38 (0.04)	-2.48	0.233	0.07 (0.005)	0.46 (0.02)	492.05	< 0.01*
TBARS ^a (nmol mg^{-1} proteína)	18.04 (2.7)	38.42 (9.89)	112.97	< 0.01*	0.13 (0.03)	0.33 (0.02)	148.38	< 0.01*
Carbonilos Proteicos ^a ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína)	1,753.31 (251.08)	2,906.24 (902.58)	65.75	< 0.01*	1.92 (0.42)	0.76 (0.25)	-60.18	< 0.01*
Proteínas Totales ^a (nmol mL^{-1})	1.12 (0.14)	1.26 (0.26)	12.69	0.01*	103.54 (21.91)	96.74 (10.44)	-6.56	0.026*

Abreviaturas: GSH-Eq, glutatión total; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; GSSG:GSH-Eq, tasa de glutatión oxidado: glutatión total; TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, cuantificadas como indicador de peroxidación de lípidos; E.S., error estándar; n, tamaño de muestra; p, significancia bilateral. *Indica diferencias significativas entre medias de muestras relacionadas cuando se comparan los métodos de colecta (por métodos tradicionales, estándar de referencia, y en papel filtro de Nobuto con factor de corrección aplicado) ($p < 0.05$). ^aMedido. ^bCalculado.

8. DISCUSIÓN

8.1. Análisis serológicos

8.1.1. *Brucella spp.*

En el presente trabajo no se detectaron anticuerpos contra *Brucella spp.* en las muestras de plasma (como estándar de referencia) en los individuos analizados (Tabla 1, Fig. 2). Por tal motivo, las muestras de leche y aquellas colectadas con el papel filtro de Nobuto, no se analizaron. La ausencia de anticuerpos contra *Brucella spp.* puede sugerir que el ganado de la región de Todos Santos, actualmente, se encuentra libre de este patógeno. Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por el SENASICA a partir de Julio 2019, fecha en que se declara a Baja California Sur como zona libre de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis* en ganado (Fig. 7) (80). Esto se logró a través de la campaña nacional contra la brucelosis en los animales con sustento en la norma oficial NOM-041-ZOO-1995, la cual tiene como objetivo controlar y erradicar del territorio nacional la brucelosis en bovinos, caprinos y ovinos, y así proteger a la producción ganadera (80).

Los factores que contribuyen a la inmunorreactividad de los animales, su salud productiva o las enfermedades pueden presentarse en diferentes dimensiones. Pueden ser variaciones únicas entre animales o rebaños (vacunados y no vacunados), variaciones particulares (entre subpoblaciones, ganado dentro de un estado o microrregión ganadera) y variaciones entre la población animal total de un país (81). Como las campañas del SENASICA ya se aplican desde hace años en esta región, la mayoría de los rebaños ya están vacunados contra estos patógenos. Con base en la información proporcionada por los propietarios, se asume que los individuos analizados en este estudio estaban previamente vacunados contra *Brucella spp.* Estudios en los que se analizaron anticuerpos contra patógenos (e.g. *Neospora caninum*) en animales previamente inmunizados no se detectaron anticuerpos en ninguno de los individuos, lo que sugiere que la reactividad que se detecta por medio de pruebas serológicas como la CAT, es directamente inducida por la exposición natural a los patógenos (65).



Figura 7. Estado zoonosanitario de la brucelosis en México (80).

8.1.2. *Anaplasma spp.*

En el presente estudio, no se identificaron anticuerpos contra *Anaplasma spp.* en ninguno de los individuos muestreados (Fig. 4). El SENASICA, por medio de la campaña nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp.*, busca erradicar el ectoparásito transmisor en áreas donde sea ecológicamente factible. De acuerdo con el avance en 2020, en Baja California Sur hay una zona, que comprende los municipios de Los Cabos y La Paz, que se encuentra en fase de erradicación, y otra zona, que involucra los municipios de Mulegé, Loreto y Comondú, reconocida como zona libre de *Boophilus spp.* (Fig. 8). Los resultados del presente estudio coinciden con los avances de la campaña para erradicar la garrapata del género *Boophilus spp.*, responsable de transmitir al patógeno *Anaplasma spp.*



Figura 8. Estado zoonosanitario de la garrapata *Boophilus spp.* en México (82).

En otros estudios, anticuerpos séricos contra *Yersinia pestis* en patos reales (64) y en coyotes (83), *Brucella spp.* en caribú (55); *Neospora caninum*, el virus del Nilo Occidental, el herpesvirus bovino tipo 1, el virus parainfluenza tipo 3, el virus respiratorio sincitial bovino, el virus de la diarrea viral bovina en renos (84), el virus de la influenza aviar en patos reales (64), el parvovirus canino y el virus del moquillo canino en mapaches y coyotes (85) se detectaron en muestras colectadas en tiras de papel de filtro de Nobuto. Los resultados de esos estudios sugieren que esta metodología puede aplicarse a agentes patógenos específicos de interés en ganado bovino y caprino.

8.2. Indicadores de estrés oxidativo

El presente estudio evaluó el uso de un método preciso, económico y mínimamente invasivo para cuantificar indicadores de estrés oxidativo en muestras de sangre y leche de ganado. La matriz del papel filtro de Nobuto estabiliza la mayoría de los analitos en la sangre seca, pero la tasa de degradación de la muestra variará según el analito (50). Es necesario evaluar la estabilidad de las moléculas en las superficies del papel filtro durante el almacenamiento, y los ensayos de reconocimiento descritos actualmente carecen de sensibilidad.

La química de la superficie y la porosidad del papel influyen en la movilización de biomoléculas. Aunque el papel filtro hecho de celulosa de alta pureza generalmente no se considera un

sustrato ideal para la inmovilización, se han propuesto diferentes enfoques para lograrlo: (i) adsorción física; (ii) acoplamiento químico en el que las moléculas se anclan a la superficie del papel mediante enlaces covalentes; (iii) acoplamiento bioquímico usando, por ejemplo, módulos de unión a carbohidratos, (iv) pigmentos bioactivos, donde las moléculas se recubren sobre partículas coloidales que luego se imprimen con inyección de tinta o se manchan sobre el papel, donde permanecen inmovilizadas debido al atrapamiento mecánico. Hasta la fecha, no hay estudios que reporten el uso el papel filtro de Nobuto para la colecta de muestras con el objetivo de cuantificar indicadores de estrés oxidativo en muestras de sangre y leche de ganado bovino y caprino.

8.2.1. Indicadores de estrés oxidativo en sangre

En este estudio, la concentración de proteínas totales se utilizó para estandarizar la concentración de indicadores de daño oxidativo. Por sí misma, la cantidad de proteína que se cuantifica en un individuo puede ser un indicador de salud. La concentración de hemoglobina en sangre es un indicador de la capacidad de las células de transportar oxígeno y nutrientes a los tejidos (86).

Ya que el estándar de referencia (sangre completa) fue congelado por más de tres semanas previas al análisis, se esperó un cambio en la concentración del contenido de proteínas de las muestras de sangre (87). La concentración total de péptidos de mayor abundancia, como la hemoglobina, fue en promedio 10% más baja en el estándar de referencia (sangre) comparado con las muestras colectadas con el papel filtro, a partir del cual se analizó la sangre seca que se adsorbió el mismo día de la colecta. Según lo reportado por Skjærvø et al., en muestras de sangre de humanos sanos, la cantidad de proteínas totales fue menor en las muestras congeladas en comparación con las muestras de sangre fresca (88). Esto es consistente con los resultados encontrados y puede deberse a la posible ruptura de los hematíes durante el almacenamiento prolongado de las muestras a -20°C .

Las concentraciones de GSH-Eq, GSH y GSSG en las muestras de sangre colectadas en el papel filtro de Nobuto fueron hasta 10 veces mayores en comparación con aquellas cuantificadas en las muestras colectadas con los métodos tradicionales. Ya que las especificaciones del papel filtro de Nobuto no están disponibles, se utilizaron las del papel filtro estándar. El tamaño de

poro del papel filtro va desde 11 a 25 μm , el grosor de 180 a 220 μm y el peso de 77 a 92 g m^{-2} dependiendo del analito que se desea retener (88).

Las mayores concentraciones de GSH-Eq, GSH y GSSG detectadas en el papel filtro, en comparación con los estándares de referencia, pueden deberse a que las enzimas que sintetizan al glutatión mantienen su actividad a bajas temperaturas y en un medio acuoso; estas propiedades ayudan a mantener la integridad de las moléculas.

No se encontraron diferencias significativas en la tasa GSSG:GSH-Eq en las muestras de sangre entre métodos de colecta ($p = 0.233$). Esto puede indicar que, a pesar de que las concentraciones de GSSG y GSH-Eq cuantificadas en las muestras colectadas con los dos métodos utilizados sean diferentes, la proporción entre ellas se mantiene estable en el papel filtro de Nobuto. Ya que la tasa de GSSG:GSH-Eq se utiliza como indicador del daño oxidativo y/o del estado redox en la célula (89), implementar el uso del papel filtro para la evaluar el estado redox con base en la tasa de GSSG:GSH-Eq en muestras de sangre de ganado puede ser viable.

Las concentraciones de TBARS en las muestras de sangre colectadas con el papel filtro de Nobuto, fueron más del 100% mayores en comparación con el estándar de referencia. La composición de ácidos grasos en sangre de bovinos sanos se menciona en la Tabla 6. La composición lipídica y la cantidad de los ácidos grasos en plasma y glóbulos rojos son el resultado de varios procesos; por ejemplo, la ingesta dietética, la absorción intestinal, el metabolismo y almacenamiento (90). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son la principal fuente de hidroperóxidos, productos altamente lábiles que al reaccionar con el TBA aumentan las concentraciones de TBARS en sangre. Ya que los PUFA son altamente susceptibles a la peroxidación, es probable que las condiciones en que se almacenó el papel filtro aumentase la concentración de éstos y, así, de los TBARS.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos en leche (91) y sangre (90) de ganado.

Componente	Leche	Sangre
SFA	70%	41%
MUFA	24%	22%
PUFA	2%	35%
HUFA	2.5%	27%

Abreviaciones: SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados.

La concentración de carbonilos proteicos en las muestras de sangre colectadas con el papel filtro de Nobuto fue 60% mayor a aquella del estándar de referencia. En condiciones normales, los sistemas de oxidación catalizada por metales son la principal fuente de daño oxidativo a proteínas (35). En presencia de metales de transición, Fe(II) o Cu(I), las especies reactivas de oxígeno son convertidas en radicales libres, sustancias altamente reactivas capaces de reaccionar con cualquier sustancia orgánica, como las proteínas, modificando su estructura para así llevarlas a su degradación (35).

Una manera de medir la oxidación de las proteínas es determinando los niveles de carbonilos proteicos. Prácticamente todo tipo de residuos de aminoácidos de proteínas son objetivos potenciales para la oxidación por radicales libres. Los residuos de aminoácidos más probables para formar derivados de carbonilos son lisina, arginina, prolina e histidina (75).

El contenido de carbonilos proteicos (nmol mg^{-1} proteína) se ha reportado para diferentes tejidos de ratas sanas; por ejemplo, suero (0.5-1.0), músculo cardíaco (2.2), y músculo gastrocnemio (1.8-2.2). El procedimiento usando DNPH para estimar los niveles de carbonilos proteicos es sensible y reproducible. Se puede usar para muestras hasta con 0.5 mg de proteína; sin embargo, para obtener datos reproducibles la cantidad óptima de proteína contenida se sugiere que sea de 2 mg de proteína por muestra.

La discrepancia en la concentración de carbonilos proteicos entre las muestras de papel filtro y el estándar de referencia puede atribuirse a que la cantidad de proteínas totales cuantificadas en sangre no es suficiente para realizar el análisis. Alternativamente, puede deberse a la deshidratación de las muestras en el papel filtro de Nobuto almacenado en sobres de papel no herméticos.

8.2.2. Indicadores de estrés oxidativo en leche

Hasta la fecha, no hay evidencia sobre el uso de papel filtro de Nobuto para la colecta y almacenamiento de muestras de leche destinadas, ni para el uso de estas muestras en la evaluación de ningún analito.

La concentración de proteínas totales en las muestras de leche fue 6% menor en aquellas colectadas con el papel filtro de Nobuto que en el estándar de referencia. Ya que la variación

entre métodos de colecta es mínima; el papel filtro de Nobuto podría utilizarse para cuantificar proteínas totales en leche de ganado bovino y caprino.

Las concentraciones de GSH-Eq y GSH cuantificadas en las muestras de leche colectadas con el papel filtro de Nobuto fueron 50% menores en los estándares de referencia. La concentración de GSSG cuantificada en las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto fue casi el doble de aquella cuantificada en el estándar de referencia. La mayor concentración de GSSG puede indicar que en el papel filtro, la leche de ganado bovino y caprino está oxidándose por la falta de medio acuoso y la exposición al aire y cambios en la temperatura ambiental.

La concentración de TBARS en leche fue hasta 150% mayor en las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto que en el estándar de referencia. La leche del ganado bovino y caprino contiene aproximadamente 87% agua, 4.6% lactosa, 4.2% lípidos, 3.4% proteínas, 0.8% minerales y 0.1% vitaminas (91). La grasa láctea consiste principalmente en triglicéridos (98%); mientras que el resto de los lípidos son diacilglicerol (2%), colesterol (0.5%), fosfolípidos (1%) y ácidos grasos libres (0.1%) (92). La composición de la leche se modifica continuamente en función de la raza, la alimentación, la fase de lactancia y el estado de salud del animal (93). Los lípidos de la leche bovina están presentes principalmente en glóbulos como emulsión de aceite en agua (94). En la Tabla 6, se menciona la composición de ácidos grasos en la leche. Al igual que la sangre, los PUFA responsables de generar la peroxidación de lípidos pueden estar concentrándose por el método de almacenamiento en el papel filtro.

El valor porcentual promedio de la concentración de TBARS en las muestras colectadas en papel filtro de Nobuto fue aproximadamente 100% mayor en las muestras de sangre y 150% mayor en las muestras de leche que en su estándar de referencia (Tabla 5). No es sorprendente que la concentración de TBARS de las muestras de leche y sangre difieran significativamente entre sí. Cada tipo de muestra contiene cantidades diferentes de triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos y ésteres; por lo tanto, la cantidad de productos de peroxidación es variable.

La concentración de proteínas carboniladas en leche fue 60% menor en las muestras colectadas con el papel filtro de Nobuto, a comparación de aquellas colectadas con métodos tradicionales.

La leche destaca por la cantidad de lípidos complejos. Esta abundancia es el resultado del proceso biosintético de secreción de glóbulos de grasa de la leche en el que los glóbulos se

envuelven en una capa completa de la membrana plasmática de células epiteliales. La estructura coloidal única de los glóbulos de grasa todavía se están estudiando, pero los complejos lípidos de la leche proporcionan ventajas fisiológicas, como la estabilidad frente a altas temperaturas (95).

9. CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación sugieren que no hay anticuerpos plasmáticos contra *Brucella abortus* y *Anaplasma* spp. en el ganado analizado.

Se detectaron indicadores de estrés oxidativo en el papel de filtro de Nobuto para todas las variables en sangre y leche de ganado, con una frecuencia relativa mayor al 75% del total de muestras.

En las muestras de sangre, las concentraciones de GSH-Eq, GSH, GSSG, TBARS y carbonilos proteicos cuantificadas en el papel filtro de Nobuto no fueron comparables con aquellas cuantificadas en el estándar de referencia (muestras colectadas por métodos tradicionales). Sin embargo, se observó una relación entre la tasa GSSG:GSH-Eq cuantificada en el papel filtro de Nobuto y en el estándar de referencia. Estos resultados sugieren que se puede estimar el daño oxidativo del individuo por medio de la tasa GSSG:GSH-Eq utilizando las tiras de papel filtro de Nobuto como método de colecta.

En las muestras de leche, las concentraciones de GSH-Eq, GSH, GSSG, TBARS, carbonilos proteicos y la tasa GSSG:GSH-Eq cuantificadas en el papel filtro de Nobuto fueron significativamente diferentes a aquellas cuantificadas en el estándar de referencia (muestras colectadas por métodos tradicionales).

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en detectar concentraciones de indicadores de estrés oxidativo en muestras de leche y sangre de ganado colectadas con el papel filtro de Nobuto. Por sus características, el papel filtro de Nobuto puede llegar a ser idóneo para el análisis de moléculas más estables. Sin embargo, parámetros como el grosor, peso, porosidad y aditamentos en el papel filtro deben adecuarse según el analito que será evaluado.

9.1. Recomendaciones

El papel filtro de Nobuto es un método útil para detectar moléculas estables en condiciones ambientales normales (e.g. anticuerpos y metales pesados). Debido a la naturaleza de los indicadores de estrés oxidativo, la colecta con el papel filtro de Nobuto no logra la retención de estos analitos.

Para retener analitos de esta naturaleza, se recomienda hacer los análisis lo más pronto posible (no más de dos meses después de la colecta), sobre todo en climas áridos, donde la pérdida de la hidratación en las muestras colectadas en el papel filtro es más rápida.

Buscar mantener las muestras en condiciones controladas, para esto se considera los siguiente:

1. Agregar a las muestras aditivos que conserven la actividad antioxidante de las muestras, como el hidroxitolueno butilado (96).
2. Almacenar las muestras de papel filtro en sobres cubiertos de cera para retrasar la deshidratación en el papel filtro por factores ambientales.
3. Resguardar las muestras, una vez secas, en refrigeración para evitar la degradación de los analitos por temperaturas elevadas o variables.
4. Modificar químicamente el papel filtro antes de la colecta incorporando enzimas para estabilizar proteínas. En otros estudios en donde se utiliza el papel filtro, han utilizado enzimas, como la tripsina, para optimizar sus resultados obteniendo su mayor eficiencia con 1.25 mg de tripsina como inmovilizador (88).

10. LITERATURA CITADA

1. FAO. Producción pecuaria en América Latina y el Caribe | Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 29]. Available from: <http://www.fao.org/americas/prioridades/produccion-pecuaria/es/>
2. García-Vega J, Williams GW. The Mexican Livestock, Meat, and Feed Grain Industries: A Dynamic Analysis of U.S.- Mexico Economic Integration. 1996.
3. CONAGUA. Precipitación (nacional) [Internet]. 2019 [cited 2020 Jul 16]. Available from: <http://sina.conagua.gob.mx/sina/tema.php?tema=precipitacion&ver=reporte&o=2&n=nacional>
4. FAO. Pastoreo | Apoyo en materia de políticas y gobernanza | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura | Policy Support and Governance | Food and Agriculture Organization of the United Nations [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 15]. Available from: <http://www.fao.org/policy-support/policy-themes/pastoralism/es/>
5. FAO. FAO - División de Producción y Sanidad Animal [Internet]. 2014 [cited 2020 Jul 15]. Available from: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_productions.html
6. FAO. Papel del ganado domestico en el control de la desertificacion. Santiago, Chile; 1993.
7. Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, et al. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* (80-). 2010;327(5967):812–8.
8. Garnett T. Livestock-related greenhouse gas emissions: impacts and options for policy makers. *Environ Sci Policy*. 2009;12(4):491–503.
9. Goulding K, Jarvis S, Whitmore A. Optimizing nutrient management for farm systems. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2008;363(1491):667–80.
10. Harfeld J. Husbandry to Industry: Animal Agriculture, Ethics and Public Policy. *Between Species An Online J Study Philos Anim*. 2010;13(10).
11. Haber W. Energy, food, and land - The ecological traps of humankind. *Environ Sci Pollut Res*. 2007;14(6):359–65.
12. Wilkins RJ. Eco-efficient approaches to land management: A case for increased integration of crop and animal production systems. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2008;363(1491):517–25.
13. Bremer VR, Liska AJ, Klopfenstein TJ, Erickson GE, Yang HS, Walters DT, et al. Emissions Savings in the Corn-Ethanol Life Cycle from Feeding Coproducts to Livestock. *J Environ Qual*. 2010;39(2):472–82.
14. Steinfeld H, Gerber P. Livestock production and the global environment: Consume less or produce better? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18237–8.
15. Plachter H, Hampicke U. Livestock grazing and nature conservation objectives in Europe. In: *Large-scale Livestock Grazing: A Management Tool for Nature Conservation*. Berlin: Springer-Verlag; 2010. p. 2–25.
16. Sutherland WJ, Aveling R, Brooks TM, Clout M, Dicks L V., Fellman L, et al. A horizon scan of global conservation issues for 2014. *Trends Ecol Evol*. 2014;29(1):15–22.
17. CDC. Farm Animals | Healthy Pets, Healthy People | CDC [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 31]. Available from: <https://www.cdc.gov/healthypets/pets/farm-animals.html>
18. Broom D. Animal welfare: concepts, study methods and indicators. *Rev colomb cienc*

- pecu. 2011;24(3):306–21.
19. OIE. Sistema Mundial de Información zoonosológica [Internet]. 2019 [cited 2020 Jul 29]. Available from: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation
 20. Welfare Quality Network. Welfare Quality Network | Certificado Bienestar Animal IRTA Welfare Quality [Internet]. 2019 [cited 2020 Jul 16]. Available from: <http://www.welfarequality.net/es-es/certificacion-welfare/>
 21. Gea GS, Trollet JC. Salud Animal. 2001;1–9.
 22. SENASICA. Salud Animal | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria | Gobierno | gov.mx [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 29]. Available from: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/acciones-estrategicas-de-salud-animal>
 23. SENASICA. SITUACION ZOOSANITARIA EN LOS ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA. 2020.
 24. OIE. Brucellosis. In: OIE Terrestrial Manual 2018. 2018. p. 355–98.
 25. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet Microbiol. 2002;90(1–4):435–46.
 26. Luna-Martínez JE, Mejía-Terán C. Brucellosis in Mexico: Current status and trends. Vet Microbiol. 2002;90(1–4):19–30.
 27. OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). In: International Journal of Livestock Research. Sixth. 2008. p. 146.
 28. SENASICA. Garrapata *Boophilus* spp. | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria | Gobierno | gov.mx [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 29]. Available from: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-para-el-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>
 29. Knowles D, De Echaide ST, Palmer G, McGuire T, Stiller D, McElwain T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. J Clin Microbiol. 1996;34(9):2225–30.
 30. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet Parasitol. 2010;167(2–4):95–107.
 31. Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T, Soma GI. ROS and innate immunity. Anticancer Res. 2009;29(3):817–22.
 32. Kumar V, Cotran R, Robbins S. Acute and chronic inflammation. Basic Pathol. 1992;31.
 33. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. Am J Med. 2000;109(1):33–44.
 34. Babior BM. Burst of Phagocytes. J Clin Invest [Internet]. 1984;73(March):599–601. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC425058/pdf/jcinvest00131-0009.pdf>
 35. Stadtman ER, Levine RL. Protein Oxidation. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2006 Jan 25;899(1):191–208. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>
 36. Negre-Salvayre A, Audebert N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. Free Radic Res. 2010;44(10):1125–71.
 37. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. Oxford Sci Publ. 1989;
 38. Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. Am J Med. 1991;91(3 C):S31–8.
 39. Wu G, Fang Y, Yang S, Lupton J, Turner N. Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr. 2004;134(3):489–92.

40. FAO. FAO - División de Producción y Sanidad Animal - Ganado y Sanidad Animal [Internet]. 2015 [cited 2020 Jul 29]. Available from: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/animal_health.html
41. USDA. Animal Health | National Institute of Food and Agriculture [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 31]. Available from: <https://nifa.usda.gov/topic/animal-health>
42. Fridovich I. Superoxide radical and superoxido dismutase. *Annu Rev Biochem.* 1995;97–112.
43. Hampton M, Kettle A, Winterbourn C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998;92:3007–17.
44. What is One Health? - One Health Global Network One Health Global Network [Internet]. [cited 2021 Apr 15]. Available from: <http://www.onehealthglobal.net/what-is-one-health/>
45. Society WC. One World, One Health: Building Interdisciplinary Bridges to Health in a Globalized World Conference. 2004.
46. FAO. Sanidad animal | FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 29]. Available from: <http://www.fao.org/animal-health/es/>
47. Eiros-Bouza JM, Oteo-Revuelta JA. Enfermedades infecciosas zoonóticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2011 Mar;29(Supl 3):51–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X11700283>
48. Morner T, Obendorf DL, Artois M, Woodford MH. Diseases of wildlife occur in many different forms in a wide range of animal species and populations. *Rev Sci Tech* [Internet]. 2002;21(1):67–76. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/febb/e72403d6cfa0ce328b0af28bef1fe5d2685.pdf>
49. OIE. Collection and shipment of diagnostic specimens. In: OIE Terrestrial Manual 2008 [Internet]. 2008. p. 1–14. Available from: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/1.1.0_1_COLLECTION.pdf
50. McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography.* 2007;44(4):899–925.
51. Alfazil AA, Anderson RA. Stability of benzodiazepines and cocaine in blood spots stored on filter paper. *J Anal Toxicol.* 2008;32(7):511–5.
52. Burse VW, Deguzman MR, Korver MP, Najam AR, Williams CC, Hannon WH, et al. Preliminary investigation of the use of dried-blood spots for the assessment of in utero exposure to environmental pollutants. *Biochem Mol Med.* 1997;61(2):236–9.
53. Nobuto K, Katsube Y, Hagiwara T, Ueda K, Miyakawa H, Imaizumi K, et al. Studies on Toxoplasmosis. *Jpn J Med Sci Biol.* 1967;20:413–9.
54. Wolff KL, Hudson BW. Paper-Strip Blood-Sampling Technique for the Detection of Antibody to the Plague Organism *Yersinia pestis*. *Appl Microbiol.* 1974;28(2):323–5.
55. Curry PS, Elkin BT, Campbell M, Nielsen K, Hutchins W, Ribble C, et al. Filter-paper blood samples for elisa detection of brucella antibodies in caribou. *J Wildl Dis.* 2011;47(1):12–20.
56. Kuiken T, Leighton FA, Fouchier RAM, LeDuc JW, Peiris JSM, Schudel A, et al. Pathogen surveillance in animals. *Science (80-)* [Internet]. 2005;309(5741):1680–1. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed7&NEWS=N&AN=2>

005411366

57. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451(7181):990–3.
58. Bang IC. *Der Blutzucker*. Wiesbaden, Bergmann; 1913.
59. Chapman OD. The Complement-Fixation Test for Syphilis. *Arch Derm Syphilol* [Internet]. 1924 May 1;9(5):607. Available from: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.1924.02360230067010>
60. Guthrie R, Susi A. A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics*. 1963;32(September):338–43.
61. La Du BN, Michael PJ. An enzymatic spectrophotometric method for the determination of phenylalanine in blood. *J Lab Clin Med*. 1960;55:491–6.
62. Costa MN, Veigas B, Jacob JM, Santos DS, Gomes J, Baptista P V., et al. A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: Lab-on-paper. *Nanotechnology*. 2014;25(9).
63. Avakian AP, Dick JW. Comparison of filter-paper-eluted whole blood with serum in fowl cholera serology using the enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis*. 1985;29(4):1277–80.
64. Dusek RJ, Hall JS, Nashold SW, TeSlaa JL, Ip HS. Evaluation of Nobuto Filter Paper Strips for the Detection of Avian Influenza Virus Antibody in Waterfowl. *Avian Dis Dig*. 2011;6(4):e30–1.
65. Curry PS, Ribble C, Sears WC, Hutchins W, Orsel K, Godson D, et al. Blood collected on filter paper for wildlife serology: Detecting antibodies to *Neospora caninum*, west Nile virus, and five bovine viruses in reindeer. *J Wildl Dis*. 2014;50(2):297–307.
66. Hansen CM, Hueffer K, Gulland F, Wells RS, Balmer BC, Margaret Castellini J, et al. Use of cellulose filter paper to quantify whole-blood mercury in two marine mammals: Validation study. *J Wildl Dis*. 2014;50(2):271–8.
67. Mateo-Cid LE, Mendoza-Gonzales AC. Algas marinas bentónicas de Todos Santos, Baja California Sur, Mexico. *Acta Botánica Mex*. 1994;921793(921793):31–47.
68. Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Laboratory Techniques in Brucellosis. In: Monograph Series No 55. Second Ed. Geneva: World Health Organization; 1975. p. 110–1.
69. Nielsen K, Gall D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: A review. *J Immunoassay Immunochem*. 2001;22(3):183–201.
70. Torioni De Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J Clin Microbiol*. 1998;36(3):777–82.
71. Strik NI, Alleman AR, Barbet AF, Sorenson HL, Wamsley HL, Gaschen FP, et al. Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(3):262–8.
72. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* [Internet]. 1980 Jul;106(1):207–12. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/33.556?from=CrossRef>
73. Hermes-Lima M, Storey KB. Role of antioxidant defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*. *Mol Cell Biochem*. 1998;189(1–2):79–89.

74. Levine RL, Williams JA, Stadtman EP, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994;233(C):346–57.
75. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233(C):357–63.
76. Persky AM, Green PS, Stublely L, Howell CO, Zaulyanov L, Brazeau GA, et al. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000;223(1):59–66.
77. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 May;72(1–2):248–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>
78. Helsel DR. Less than obvious: Statistical treatment of data below the detection limit. *Environ Sci Technol.* 1990;24(12):1766–74.
79. Farnham IM, Singh AK, Stetzenbach KJ, Johannesson KH. Treatment of nondetects in multivariate analysis of groundwater geochemistry data. *Chemom Intell Lab Syst.* 2002;60(1–2):265–81.
80. SENASICA. Declara Agricultura libre de brucelosis bovina, caprina y ovina a Baja California Sur [Internet]. 2019 [cited 2020 Sep 27]. Available from: <https://www.gob.mx/senasica/prensa/declara-agricultura-libre-de-brucelosis-bovina-caprina-y-ovina-a-baja-california-sur>
81. Astudillo V, Zottele A, Dora F. Análisis epidemiológico y atención veterinaria en salud animal. *Cent Panam Fiebre Aft.* 1993;65–70.
82. SENASICA. Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus* spp. [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 29]. Available from: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>
83. Chandler JC, Baeten LA, Griffin DL, Gidlewski T, DeLiberto TJ, Petersen JM, et al. A bead-based flow cytometric assay for monitoring yersinia pestis exposure in wildlife. *J Clin Microbiol.* 2018;56(7):1–12.
84. Curry PS, Ribble C, Sears WC, Orsel K, Hutchins W, Godson D, et al. Blood collected on filter paper for wildlife serology: Evaluating storage and temperature challenges of field collections. *J Wildl Dis.* 2014;50(2):308–21.
85. Kamps AJ, Dubay SA, Langenberg J, Maes RK. Evaluation of trapper-collected nobuto filter-paper blood samples for distemper and parvovirus antibody detection in coyotes (*Canis latrans*) and raccoons (*Procyon lotor*). *J Wildl Dis.* 2015;51(3):724–8.
86. Merdana IM, Sulabda IN, Tiasnitha NMWA, Gunawan IWNF, Sudira IW. Erythrocyte, hemoglobin and hematocrit profile of Bali Cattle during the various periods of parturition. *J Anim Heal Prod.* 2020;8(2):75–9.
87. Alberghina D, Casella S, Giannetto C, Marafioti S, Piccione G. Effect of storage time and temperature on the total protein concentration and electrophoretic fractions in equine serum. *Can J Vet Res.* 2013;77(4):293–6.
88. Skjærvø Ø, Halvorsen TG, Reubsaet L. Smart blood spots for whole blood protein analysis. *Analyst.* 2018;143(13):3184–90.
89. Kosower NS, Kosower EM. The Glutathione Status of Cells. Vol. 54, *International Review of Cytology.* 1978. 109–160 p.
90. Risé P, Eligini S, Ghezzi S, Colli S, Galli C. Fatty acid composition of plasma, blood cells and

whole blood: Relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2007;76(6):363–9.

91. Lindmark-Månsson H, Fondén R, Pettersson HE. Composition of Swedish dairy milk. *Int Dairy J*. 2003;13(6):409–25.
92. Newburg DS, Neubauer SH, Jensen RG. Handbook of milk composition. RG J, editor. San Diego: Academic Press; 1995. 273_349.
93. Walstra P, Jenness R. Dairy chemistry & physics. John Wiley & Sons; 1984.
94. Fox PF, McSweeney PLH. Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids. *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids*. 2006.
95. German JB, Dillard CJ, Ward RE. Bioactive components in milk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(6):653–8.
96. Yehye WA, Rahman NA, Ariffin A, Abd Hamid SB, Alhadi AA, Kadir FA, et al. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *Eur J Med Chem*. 2015;101:295–312.