



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

*Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLAN"*

*ESTUDIO DE UN BROTE DE ABORTOS
EN UN HATO DE BOVINOS HOLSTEIN
LOCALIZADO EN OAXACA, OAX.*

T E S I S

*Que para obtener el Título de:
Médico Veterinario Zootecnista*

p r e s e n t a

FERNANDO XICOTENCATL PLATA PEREZ

*Director de la Tesis
M.V.Z., M. A. Pablo Correa Girón*

1986

Cuautitlán Izcalli, Estado de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

Págs.

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
2.1 Disyñesis reproductiva	3
2.2 Categoría de la disyñesis reproductiva	3
2.3 Inmunología fetal y del tracto reproductor	13
2.4 Etiologías de los abortos	16
2.5 Diagnóstico	16
3. OBJETIVO	50
4. MATERIAL Y METODOS	51
5. RESULTADOS	53
6. DISCUSION	57
7. CONCLUSIONES	62
APENDICES:	
APENDICE No. 1	63
APENDICE No. 2	65
APENDICE No. 3	68
APENDICE No. 4	69
APENDICE No. 5	70
APENDICE No. 6	73
APENDICE No. 7	74
APENDICE No. 8	76
APENDICE No. 9	77
APENDICE No. 10	79
APENDICE No. 11	80
APENDICE No. 12	82
APENDICE No. 13	83
APENDICE No. 14	84
APENDICE No. 15	87
APENDICE No. 16	89
APENDICE No. 17	92
APENDICE No. 18	93
APENDICE No. 19	94
APENDICE No. 20	95
APENDICE No. 21	97
APENDICE No. 22	99

<i>TABLA No. 1</i>	<i>Págs.</i>
<i>GRAFICA No. 1</i>	<i>100</i>
<i>GRAFICA No. 2</i>	<i>101</i>
<i>CUADRO No. 1</i>	<i>102</i>
<i>CUADRO No. 2</i>	<i>103</i>
<i>CUADRO No. 3</i>	<i>104</i>
<i>CUADRO No. 4</i>	<i>107</i>
<i>CUADRO No. 5</i>	<i>108</i>
<i>CUADRO No. 6</i>	<i>109</i>
<i>CUADRO No. 7</i>	<i>110</i>
<i>CUADRO No. 8</i>	<i>113</i>
<i>8. BIBLIOGRAFIA</i>	<i>114</i>
	<i>115</i>

1. RESUMEN

En México, las pérdidas económicas ocasionadas por abortos se ven reflejadas en la disminución de los lecerros, los cuales pueden ser un subproducto importante, además de que la producción de leche se ve directamente afectada.

Historia clínica: el hato se constituyó por 250 vacas y 70 lecerros. En el año de 1983 hubo 40 abortos (16 % anual). En 1984 hubo 33 abortos (13.2 % anual). Los abortos se presentaron entre los 2 y los 6 meses de gestación principalmente. Se realizaron -- pruebas serológicas para el diagnóstico de Bacillus abortus, Leptospira, IBR, BVD, PI-3; y se hicieron cultivos de exudado cervicovaginal para el aislamiento de agentes bacterianos; y cultivos para aislar Tritrichomonas foetus.

Los cultivos para el aislamiento bacteriano mostraron la -- presencia de Corynebacterium spp., Agrobacterium spp., Streptococcus spp., y Campylobacter spp. La prueba de tarjeta para el diagnóstico de Bacillus abortus fue positiva en 42 de los 320 animales muestreados, sin embargo todos los sueros fueron negativos a la prueba de fijación del complemento. En las pruebas de aglutinación microscópica para el diagnóstico de leptospirosis, en un animal hubo títulos negativos primero y después de 1:50, contra L. pomona. En las pruebas serológicas 4 vacas presentaron títulos inhibición de la hemaglutinación de 1:20, contra PI-3; cuatro vacas mostraron un aumento significativo en sus títulos de anticuerpos contra IBR; mientras que 10 vacas mostraron un aumento no significativo. Hubo títulos bajos de anticuerpos contra BVD. No hubo crecimiento de Tritrichomonas foetus.

Los principales agentes detectados en dicho hato fueron: IBR, BVD y PI-3.

2. INTRODUCCION.

Las pérdidas económicas ocasionadas por abortos se ven directamente reflejadas en las pérdidas de los lecheros, los cuales, en las explotaciones lecheras son un subproducto importante; también la producción misma de la leche se ve directamente afectada (39).

Se considera que el porcentaje normal de abortos en un rebaño de bovinos lecheros va de un 3 a un 5 % anual (4, 39).

En México los abortos y otros problemas reproductivos son de especial importancia debido a las considerables pérdidas económicas que representan (41).

Una de las formas más comunes en que se ve afectada la economía de la explotación es el alargamiento del periodo entre-partos, sea por problemas reproductivos, por deficiencia de manejo o por ambas cosas (10).

En ocasiones se presentan problemas reproductivos y el ganadero insemina a los animales durante varios ciclos estrales, y muchas veces se logra la gestación. Sin embargo, queda en duda si el problema que interfiere al animal para lograr su primer parto, prevalecerá en los siguientes (10).

México se encuentra con una gran necesidad de aumentar la producción de alimento de origen animal. Esto se puede lograr a través de programas pecuarios, entre otros, de mejoramiento genético, medicina preventiva, manejo y alimentación (10).

Los problemas patológicos son, sin duda, uno de los factores más importantes que limitan la productividad animal, no solo por ser causa de la disminución o pérdida total de la capacidad productiva, sino porque impiden la evaluación correcta de los animales (66). El cuadro 1 muestra que en México las causas más comunes de desecho correspondieron a las afecciones del aparato reproductor, seguida por enfermedades infecciosas e incostabilidad económica (66).

Dentro de los problemas del aparato reproductor, infertilidad representa un 43.9 % de las causas de desecho (66).

Al comparar estos resultados con los encontrados en la li

literatura (Cuadro 2), se nota que en Inglaterra, EUA, Australia-- y otros países desarrollados, el porcentaje de desecho de vacas, por problemas reproductores es más bajo que en nuestro país; incluso esta situación les permite a ellos incluir dentro del desecho a los animales malos productores, realizando simultáneamente en esta forma un mejoramiento genético (66). Es posible también que en nuestro medio, dada la falta de registros precisos de producción, el desecho de vacas por baja producción se este realizando actualmente solo en casos individuales extremos. El nivel de desecho encontrado en México y comparando con otros estudios indica que las condiciones de alimentación, sanidad y manejo que afectan el proceso reproductivo, pueden y deben mejorarse considerablemente (66).

Se ha encontrado que las afecciones del aparato reproductor representan un 58 % de las causas de desecho en México (66). La edad promedio del desecho de vacas problemas corresponde a los 4 años con 8 meses de edad, es decir a los 2,96 partos, mientras que en los países desarrollados el promedio se encuentra entre los 5 y 7 años de edad (66).

2.1 La DISGENESIS REPRODUCTIVA es un término usado para describir todas las categorías de fallas reproductivas, sin tomar en cuenta la causa y en que etapa del período de gestación ocurren estas pérdidas (44).

Las pérdidas que ocurren desde la concepción hasta que la diferenciación embrionaria es completa (aproximadamente a los 45 días), son denominadas MORTALIDAD EMBRIONARIA. Aquellas pérdidas que ocurren durante el período fetal, el cual va desde la diferenciación hasta el parto, se encuentran divididas en ABORTOS y PARTOS PREMATUROS. Un aborto es la expulsión, antes de término, de un producto incapaz de vivir independientemente.

Mientras que, un parto prematuro, es la expulsión antes de término, de un feto capaz de vivir independientemente (45).

2.2 CATEGORIAS DE LA DISGENESIS REPRODUCTIVA.

Las pérdidas ocurridas durante el período de diferenciación embrionaria, puede ser situadas dentro de tres amplias ca-

tegorías, basadas en sus causas, estas son: Genéticas, Ambientales, Infecciosas.

Causas Genéticas.- Los factores genéticos incluyen anomalías de los cromosomas o de los genes, que resultan en defectos desarrollados por el embrión o el feto. La proporción de falla reproductiva atribuida a los factores genéticos es muy alta, y podría constituir de uno a dos tercios de las pérdidas que se presentan después de la fertilización. Estas pérdidas en los humanos tienden a ocurrir al principio de la gestación principalmente dentro del primer mes. La mayor parte de las pérdidas debidas a causas genéticas pasan sin ser reconocidas, en las cuales el feto desarrolla alteraciones macroscópicas reconocibles (44).

Factores Ambientales.- Los factores ambientales que resultan en una falla reproductiva son numerosos, e incluyen los efectos de algunas causas, tales como: Fallas nutricionales, edad, y condición de la hembra al servicio, hormonas exógenas y compuestos tóxicos. La proporción de pérdidas en esta categoría es desconocida (45).

En Canadá las otras causas de abortos han sido divididas en varias categorías, éstas incluyen causas: térmicas, nutricionales tóxicas e infecciosas (45).

Causas Térmicas.- Las causas térmicas de aborto, están usualmente asociadas con un aumento a la temperatura, mas que con una baja de la misma. Las vacas gestantes expuestas a una alta temperatura ambiental tienen un incremento en su propia temperatura corporal, respiración y ritmo cardíaco al compararlas con vacas no gestantes (45). Los efectos que el "stress" del calor produce en el aparato reproductivo están asociados con una disminución de la fertilidad cerca de la época de empadres; además retrasa la pubertad, causa anestro y deprime la actividad en el estro. Hay algunas evidencias que sugieren que los abortos pueden ocurrir cuando existen aumentos repentinos en la temperatura, aunque esta manifestación es probablemente rara (45).

Factores Nutricionales.- Los factores nutricionales están más comúnmente asociados con infertilidad que con aborto (45). El peso de las novillas antes de la monta tiene una alta influen-

cia en la fase de gestación, sin embargo, el subsecuente desempeño reproductivo tiende a ser poco afectado por el peso del animal. Moustgaard establece que si durante la gestación, la mal nutrición se hace coincidir con el primer tercio de la gestación, durante los sensibles períodos de organogénesis, se puede presentar como secuela el desarrollo de malformaciones, e incluso la muerte fetal (45). En el estudio fetal (2do. y 3er tercio), dichas deficiencias pueden resultar en disturbios funcionales. En la extrema deficiencia se ocasionará la muerte o el nacimiento de crias no viables (45).

Roberts reporta que una inanición aguda severa puede resultar en abortos, y que este acto, es un mecanismo protector para preservar las reservas corporales de la madre. Los animales emaciados pueden abortar; sin embargo, después del aborto los animales permanecen echados, retienen las membranas fetales y mueren en pocos días. El aborto o parto prematuro, en estos casos no preserva la vida del animal, pero anuncia la terminación de la gestación. La inducción del parto en una época temprana sería lo indicado (45). El estado en el cual la deficiencia se desarrolla y la agudeza, y severidad de la deficiencia, todos en conjunto, determinan las manifestaciones observadas.

La deficiencia de vitamina A puede ocasionar abortos usualmente al final de la gestación, pudiendo ocurrir también la presentación de becerros muertos al momento del parto, débiles, cigos o con otras malformaciones. Esta deficiencia puede ser diagnosticada por la observación de Metaplasia escamosa del Epitelio que recubre al conducto salival paratideo (45).

Hastings y Foulkner reportan una condición manifestada por el nacimiento de becerros muertos, débiles o prematuros y una alta incidencia de retenciones placentarias, que aparentemente respondieron a las inyecciones de vitamina E y Selenio.

Lesiones en el miocardio y músculo esquelético, similares a las observadas en deficiencia de vitamina E y Selenio, son ocasionalmente reportadas en los fetos bovinos afeccionados (45). La importancia de esta lesión como una causa de aborto, no ha sido documentada experimentalmente en los bovinos (45).

Causas tóxicas. - Frecuentemente se sospecha que sustancias o plantas tóxicas están involucradas como causa de aborto. Pero son usualmente difíciles de documentar. Los nitratos pueden encontrarse en esta categoría (28, 45). El efecto del consumo -- de "aguja" (hojas) de pino", las plantas que causan locura y la warfarina deben ser también considerados.

La ingestión de "aguja de pino" (Pinus ponderosa) y el --- subsiguiente aborto ha sido reportado a través del Oeste de Canadá y los Estados Unidos. Los repentinos cambios de tiempo que -- orillan a los novillos a buscar refugio, la escasez de alimento, -- la tala de árboles y el repentino acceso a las "agujas de pino" -- han sido reportadas como las causas de consumo de las mismas. La tasa de abortos puede ser muy baja o mayor del 50 %, los abortos usualmente ocurren en el último tercio de la gestación y pueden tener lugar 48 hrs. después de la ingestión de la planta. Experimentos en ratones, muestran que los hongos convierten algunos de los constituyentes de las "agujas" en componentes que son tóxicos para el desarrollo fetal (45). Trabajo más reciente sugieren que una toxina termoestable en la fibra de las "agujas de pino" -- pueden ser el factor más importante. Invariablemente hay retención de placenta, y frecuentemente hay mucha hemorragia. El diagnóstico, hasta que la toxina ha sido claramente identificada, será presuntivo y asociado con animales que consumen "agujas de pino" (45).

El locoísmo es descrito como la enfermedad producida por variedades tóxicas de plantas del género Oxytropis o Astragalus pertenecientes a la familia Leguminosae. El envenenamiento por la "hierba loca" ocurre en los Estados Unidos y Canadá principalmente, y es particularmente prevalente cuando las pasturas son pobres, o durante el pastoreo de invierno. La hierba loca puede estar disponible y verde cuando otras hierbas están escasas. Después de la infección de la planta tóxica, el aborto o anomalía de los fetos pueden ocurrir dependiendo del estado de gestación -- y la cantidad de plantas ingeridas. El periodo de incubación para el aborto probablemente está relacionado con la dosis. El --- efecto tóxico puede realizarse a través de la placenta y el sistema vascular fetal; sin embargo, algunas células lúteas en el

ovario están extremadamente vacuoladas, y esto puede interferir en la producción de progesterona, interrumpiendo con esto la gestación (45). En ovejas, en las cuales se han realizado la mayor parte del trabajo experimental, la tasa de abortos puede aproximarse al 45 %, dependiendo del tiempo y la cantidad de alimento (45). El diagnóstico está basado en la presencia de abortos, y malformaciones consistentes en rotación lateral de los miembros anteriores, flexión de las articulaciones carpales tendones contráidos, flexión anterior e hipermovilidad de las articulaciones del corvejón. En ovejas malformadas, hay vacuolación citoplasmática en las neuronas, núcleos contorneados renales, macrófagos de los nódulos linfoides, macrófagos del hazo, células acinares pancreáticas y epitelio linfático. En el cuerpo lúteo hay vacuolización del citoplasma, también en el epitelio coriónico de las ovejas gestantes; al parecer, estas lesiones aparentemente podrían ser reversibles y por lo tanto las pérdidas pueden ser reducidas si los animales son retirados a tiempo de las pasturas que contienen las plantas tóxicas (45).

La ingestión de warfarina produce abortos en los bovinos y algunos han pensado que es teratogénica para los niños. Es probablemente muy poco vista como un abortígeno. Esto ocurre enseguida de la ingestión accidental, después de que el alimento se contamina con ratocidas. La patogénesis del aborto y el tercio usual, en el que éste ocurre no han sido investigadas. Un componente semejante a la cumarina, que está presente en forma natural en tréboles dulces enmohecidos a sido asociado con muerte neonatal (45).

Causas infecciosas. - En los países desarrollados, en donde se ha logrado un amplio control de muchas enfermedades infecciosas, la última categoría de pérdidas debidas a abortos, es la atribuida a los agentes infecciosos.

A) Fisiopatología.

A.1) Entrada del agente etiológico a la hembra. - El agente tiene que entrar primero a la hembra, para llegar al feto. Las puertas de entrada sugeridas para algunos de los agentes infecciosos más

frecuentemente encontrados, incluyen las siguientes:

- i) piel de la hembra: Brucella abortus, Corynebacterium pseudotuberculosis.
- ii) conjuntiva: B. abortus, Lepidospira pomona.
- iii) tracto respiratorio: Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) L. pomona, Diarrea Viral Bovina (BVD).
- iv) cavidad oral: B. abortus, Listeria monocytogenes, L. pomona.
- v) vagina y cérvix: Campylobacter fetus, C. pseudotuberculosis, Tritrichomonas foetus.

Una vez en la hembra, el proceso de enfermedad puede o no tener manifestaciones clínicas diferentes a aquellas que afectan el tracto reproductivo. Algunos agentes varían a este respecto. - L. monocytogenes, pueden producir enfermedad en el sistema nervioso central y abortos concurrentes, o como es más común, el proceso puede ocurrir separadamente. Ciertos organismos pueden invadir directamente la unidad feto placentaria de la madre, o pueden en vez de esto, producir disturbios, los cuales indirectamente afectan la gestación. Los ejemplos incluyen fiebre (meningitis, mastitis, neumonía); toxemia (pielonefritis); falla circulatoria (pericarditis supurativa); hipoxia (asfonia); y endotoxemia (44).

A.2) Movimientos del agente etiológico de la hembra a la placenta. - De la hembra la infección puede pasar a la placenta por estas tres rutas:

a) Hematológica. - Esta necesita que el microorganismo sobreviva en el torrente sanguíneo, y puede ocurrir con listeriosis, brucelosis, aspergilosis, IBR y BVD.

b) A partir del útero. - Se especula que algunos agentes pueden estar presentes en el útero antes de la concepción, y su crecimiento en la placenta ocurre cuando las condiciones son adecuadas. V.G. C. pseudotuberculosis y C. fetus.

c) Ascendentes desde la vagina a través del cérvix.

A.3) Movimientos del agente etiológico de la placenta al feto. - Algunos agentes pueden trasladarse directamente de la placenta al feto por la vena umbilical, mientras que otros penetran a través de la placenta, infectando al feto por contaminación del líquido amniótico; en estos casos, la superficie del feto y el cordón umbilical están expuestos al organismo, como lo están, -- la faringe y el tracto digestivo, cuando el líquido amniótico es

tragado. La infección sistémica del feto puede resultar a consecuencia de esto, la deglución del líquido amniótico ocurre alrededor del segundo al tercer mes de gestación. Por esta razón, - el contenido atómusal es comúnmente una buena fuente de la cual aislar agentes bacterianos y micóticos en fetos abortados (44).

No se ha establecido si el virus pasa directamente al feto a través de la circulación, o si siempre ocurre la infección placentaria, esto probablemente es variable, dependiendo de la virulencia, número de partículas, etc. (44). Los virus que son más fácilmente aislados de la placenta que el feto, y pueden ser consistentemente aislados en la misma antes de que el aborto ocurra, sugieren un período de resistencia en la placenta antes de viajar hacia el feto (44). La infección por el virus de IDR, parece caer en esta categoría, y puede viajar al feto a través de la circulación fetal, o por el líquido amniótico (44).

A.4) Principales sitios de lesión en la unidad feto placentaria.

Placenta.- Las infecciones placentarias pueden ocurrir con pequeñas lesiones macroscópicas observables, y con un pequeño daño microscópico (infección por IDR), inversamente, la placenta puede ser el sitio de lesión más evidente, y la presencia del organismo, estará asociada con necrosis marcada e inflamación (A. fluminatus). Las infecciones bacterianas que invaden el útero gestante desde el cérvix, son las que probablemente -- producen placentitis con mayor frecuencia (44).

Feto.- Cuando la infección entra al feto por la vena umbilical, las lesiones pueden ser primariamente evidentes en el hígado (tal es el caso de infecciones por IDR y L. monocytogenes); sin embargo, las lesiones pueden desarrollarse simultáneamente en muchos sitios, conforme la infección progresa. Cuando el organismo viaja al feto a través del líquido amniótico, se ven comúnmente lesiones macroscópicas en la piel. En los abortos micóticos, éstas se ven en solo un tercio de los casos, -- mientras que las microscópicas se observan en mayor proporción.

Las lesiones y microorganismos presentes en el tracto digestivo, probablemente reflejan una ruta oral de infección y -- son comunes con una amplia variedad de agentes etiológicos in--

cluyendo *IBR*, *A. fumigatus* y *E. coli*.

Las lesiones pulmonares son más comunes, y pueden ser manifestaciones de: a) infección sistémica, b) organismos, creciendo en el tracto respiratorio, procedentes del líquido amniótico o - c) una activa inhalación del líquido amniótico, conteniendo microorganismos (44).

La disminución de la oxigenación fetal, puede reflejar hipoxia materna, falla circulatoria materna, interferencia en la entrega de oxígeno de la placenta a los tejidos fetales. En niños, esto a sido demostrado en casos con compresión del cordón umbilical, anomalías del cordón, o impedimento de la función cardiovascular fetal (44). Eventos similares ocurren indudablemente en los fetos bovinos. Cuando los fetos sufren hipoxia, varios eventos pueden ocurrir: se ha emitido la hipótesis de que ocurre una redistribución del flujo de sangre a los órganos vitales, la disminución de la oxigenación de los órganos no vitales, ocasionada por la vasoconstricción induce hiperperistaltismo, y retención de esfínteres en el intestino fetal; como resultado de esto el feto evacua meconio y las partes expuestas del feto se colorean, el feto en este momento, se encuentra en un estado de --- "stress" temporal compensado (los órganos vitales están bien oxigenados y hay hipoxia periférica). Si la hipoxia continúa, el feto llega al fin de su equilibrio compensatorio y entra en un estado de "stress" descompensado. Los movimientos respiratorios débiles (inefectivos), normalmente exhibidos por el feto in útero, se vuelven movimientos respiratorios fuertes, los cuales son seguidos finalmente, por violentos movimientos espasmódicos, esto es, cuando el feto está realizando movimientos respiratorios fuertes as cuando ocurre la inhalación activa del líquido amniótico y de su contenido, pudiendo resultar en bronconeumonía fetal (esto es también documentado en el hombre) (44).

Exudado con células inflamatorias mixtas, conteniendo meconio y escamas epiteliales, se ven comúnmente en las vías aéreas en los fetos bovinos abortados. Sin embargo, la prevalencia de neumonías en becerros recién nacidos, resultante de infecciones adquiridas in útero, no se ha establecido (44).

A.5 Factores que determinan los principales sitios de lesión.

La habilidad del microorganismo para causar lesiones, está influida en un grado diverso por la hembra (especie, estado de salud y experiencia antigénica previa), el estado de gestación es importante, ya que este determina el estado de órgano génesis, capacidad inmunogénica y el desarrollo físico del feto (44).

A.6) Factores que influyen en las consecuencias clínicas de la infección.

Las manifestaciones clínicas de la infección, están en función de algunos factores que actúan simultáneamente. Las lesiones causadas por la colonización de microorganismos en varios tejidos, es reflejada clínicamente, no solo por las características del organismo en particular y su habilidad para infectar, si no también, por la necesidad de el funcionamiento del órgano afectado en el útero. Lesiones severas focalizadas, tales como: neumonía intersticial, daño cerebral extensivo y defectos septales intraventriculares pueden ser de una consecuencia clínica pequeña en el útero, mientras que, después del nacimiento estas condiciones son frecuentemente fatales. Los organismos que causan lesiones placentarias, hepáticas, endóceras y circulatorias interfieren con las funciones vitales en el útero, y pueden causar manifestaciones clínicas. Las consecuencias clínicas de una placentitis, un feto enfermo, o alguna situación que produzca "stress" en el feto, están influidas por el estado de desarrollo fetal (44).

A.7) Algunas manifestaciones clínicas de la infección.

Si el feto muere in útero, puede ser absorbido, macerado, autolizado, abortado, momificado o sufrir enfisema (44).

Si el embrión muere en los primeros estados de gestación, está puede ser mantenida hasta que el embrión es absorbido. En este estado de la gestación, el embrión o la placenta no están produciendo hormonas, y la presencia del embrión evita la liberación de factores luteolíticos a partir del útero. El contenido uterino, en alguna forma, usualmente evita esta liberación hasta que la absorción es completa (44).

Cuando la gestación prosigue, la muerte del feto, antes de

que la piel se vuelva gruesa y completamente queratinizada (alrededor de los siete meses), puede resultar en momificación, si -- hay ausencia de una infección bacteriana persistente acompañada de putrefacción. Si hay putrefacción en este estado, ocurre mueración fetal (44).

La autólisis fetal puede ocurrir cuando un feto muere tan rápidamente, que no puede asegurar un parto prematuro en los últimos estados de gestación, o después de la muerte por diversas razones, en el segundo trimestre. Pero, los factores que determinan si un feto muerto va ser momificado o autolizado en la parte final del segundo, o temprana del último tercio de la gestación no se conocen muy bien (44).

Después de la muerte, es usual que se tomen de dos a cuatro días para que un feto sea expulsado del útero, en ese momento, ya hay una autólisis muy marcada. Un feto momificado puede permanecer algunos meses in situ. El mecanismo precipitante de la expulsión, en estos casos, lógicamente no requiere de un estímulo por parte del feto, y tampoco es un parto (44).

Si el feto muere en el último tercio de la gestación o durante el parto, y no es expulsado del tracto reproductivo dentro de 24 a 48 hrs., puede convertirse en un feto enfisematoso. Las bacterias que forman gas, presentes en la vagina, pueden invadir rápidamente la unidad feto placentaria, inmediatamente después de que el cervix se dilata (44).

Durante el último tercio de la preñez, un feto enfermo o estresado de otra manera (hipoxia debida a placentitis), puede asegurar su propio parto, pero con tres diferentes resultados: --
i) El feto puede ser expulsado vivo y morir. La muerte enseguida del parto puede ser la consecuencia de una malformación compatible con la vida intrauterina, pero letal después del nacimiento.

ii) El feto puede ser expulsado vivo y no poder sobrevivir. La falta para sobrevivir después de nacido, puede ser la consecuencia de una malformación congénita menor, o una infección persistente adquirida en el útero.

iii) Un feto puede asegurarse su propia vida y sobrevivir aún -- cuando está infectado (44).

2.3 INMUNOLOGIA FETAL Y DEL TRACTO REPRODUCTOR.

Los animales poseen una amplia gama de mecanismos de defensa dentro de su economía; pero el encuentro inicial con microorganismos invasores ocurre en la superficie del cuerpo, y es donde son destruidos y rechazados en su mayor parte (67).

Los sistemas de protección en las superficies corporales, consiguen este resultado estableciendo, a través de mecanismos físicos y químicos, un medio que solo puede soportar los microorganismos mejor adaptados, y que por su perfecta adaptación muestran también un bajo poder patógeno, e impiden con gran eficacia la instalación de otros microorganismos menos adaptados y posiblemente más patógenos (67).

En el aparato genitourinario, el lavado mecánico y el pH bajo de la orina, suelen bastar para proteger al animal, pero en caso de estasis urinaria, no es raro encontrar una uretritis debida al ascenso de bacterias patógenas (67).

En las hembras adultas, la vagina está revestida de un epitelio escamoso, cuyas células contienen mucho glucógeno, cuando se descaman estas células, forman un sustrato que permite el desarrollo de lactobacilos, los cuales a su vez, producen grandes cantidades de ácido láctico. El pH bajo así creado, protege la vagina contra la invasión de otras bacterias. El almacenamiento de glucógeno en las células del epitelio vaginal, aumenta por efecto de los estrógenos, y por consiguiente, es más pronunciado en los animales sexualmente maduros (67).

Además de los factores ambientales y químicos que protegen a las superficies corporales, existen dos clases de inmunoglobulinas, que generalmente se encuentran en concentraciones bastante altas en la saliva, el líquido intestinal, las secreciones nasales y traqueales, leche, calostro, orina y las secreciones de las vías genitourinarias. La inmunoglobulina E suele relacionarse con la inmunidad contra helmintos, pero la inmunoglobulina A, parece haberse creado en forma específica para la protección de las superficies corporales (67).

El moco de la vagina y del cuello uterino, contiene anticuerpos de distintas clases, en particular Ig A. En las vacas infectadas por *C. fetus*, estos anticuerpos Ig A pueden inmovili-

zan los microorganismos, y actuar como opsoninas, también se encuentran anticuerpos de la clase Ig G, que provienen del suero - por trasudación, y aumentan importantemente en casos de reacciones inflamatorias. Además, la presencia de muchas células mononucleadas, así como la capacidad de C. fetus de dar lugar a --- reacciones cutáneas tardías (hipersensibilidad tipo IV), es congruente con la hipótesis de que intervenga también la inmunidad - delida a células en la resistencia a esta infección local (67). - El líquido del lavado del prepucio de los toros infectados con - este microorganismo, puede también contener aglutininas, princi - palmente Ig G 1, con un poco de Ig M e Ig A (9). Cabe observar - una variedad similar de respuesta inmune local contra otros mi - croorganismos que ocasionan infecciones de cuello uterino y va - gina (9, 67). La presencia de anticuerpos aglutinantes en el mo - co vaginal puede aprovecharse como prueba diagnóstica de trico - sis, campilobacteriosis, triconomiasis. La respuesta inmune lo - cal, en el caso de esta última infección, se debe principalmente a la Ig E (67).

A) Ontogenia del sistema inmune.

Los órganos linfoides, tanto primarios como secundarios - del becerro, se encuentran plenamente desarrollados mucho antes - del nacimiento, se puede identificar el timo, bazo, ganglios lin - fáticos y placas de Peyer a los 40, 55, 60 y 75 días respectiva - mente, contados a partir de la fecundación (67).

Al cabo de 45 días, existen linfocitos en la sangre peri - férica de los fetos, algunas células ya muestran Ig M a los 59 - días, mientras que, para encontrar Ig G, sobre las células, hay - que esperar al día 135 (67). La época exacta, en la cual se pue - den encontrar inmunoglobulinas en el suero, dependen del método - de estudio escogido. Si se utiliza la difusión en gel, se encuen - tra algo de Ig M a los 130 días y de Ig G 1 a los 135 días. En - la mayor parte de los fetos bovinos normales no hay Ig G 2 ni - Ig A (67). El feto puede responder a cientos antígenos, antes - que otros; el feto responde a Lentovirus capripneumoniae a los 132 - días, a Anaplasm marginale a los 140 días; virus de Parainfluen - za 3 (PI-3), a los 150 días; mientras, que en el caso de lengua -

azul y B. abortus, responde hasta poco antes del nacimiento (67). El complemento hemolítico puede ser detectado alrededor del día 120. Los linfocitos de la sangre periférica del becerro, son capaces de responder a la fitohemoaglutinina a los 200 días de edad intrauterina; esta capacidad tiende a desaparecer en el momento del nacimiento, probablemente a consecuencia de las altas cifras de esteroides en el suero (67).

La capacidad del feto para responder a la estimulación antigénica, también se instala progresivamente, aunque el feto no es capaz totalmente de defensa, no se muestra tan capaz de luchar contra las infecciones como un adulto (67). Los tejidos de feto bovinos de 95 días de vida intrauterina, producen una cantidad de interferón similar a la producida por los tejidos de animales adultos (67). Algunas enfermedades pueden ser leves o subclínicas para la madre, siendo en cambio, graves o mortales en el feto (V.g. lengua azul, IBR, BVD); la respuesta contra estos microorganismos depende del grado de desarrollo inmunológico fetal (67). La vacuna contra lengua azul no es patógena para el conejo adulto normal, pero, produce graves lesiones en el sistema nervioso del feto (hidrocefalia y displasia retiniana), cuando se aplica a ovejas con 50 días de gestación, pero aplicada a los 100 días, o en corderos recién nacidos, solo produce una leve respuesta a la glia. El virus aplicado a los fetos de conejos de 50 a 70 días de gestación, puede ser encontrado en los tejidos del feto durante varias semanas; pero si se les inyecta después de los 100 días, la regla es que ya no pueda encontrarse el virus. La infección prenatal del becerro con virus de IBR siempre es mortal, mientras que, la infección postnatal es relativamente leve. La transición entre estas dos situaciones se produce durante el último mes de gestación (67). Si se infecta fetos bovinos con BVD antes de que sean capaces de crear una respuesta inmune contra la misma (día 200), habrá muerte fetal por aparición de graves malformaciones que afectan el cerebro y la cintilla óptica. Las infecciones posteriores producen hiperplasia linfocítica con aumento de la cifra de --inmunoglobulinas. Esta última respuesta es bastante frecuente; se la observa después de muchas infecciones, a las cuales, el feto sobrevive por un periodo variable. Por esta razón, la existencia-

de cifras altas de inmunoglobulinas en un animal recién nacido -- sin colostar, se considera generalmente indicio de estimulación antigénica intrauterina.

2.4 ETIOLOGIAS DE LOS ABORTOS

En la literatura se reporta un gran número de agentes etiológicos, que pueden estar involucrados en la presentación de abortos en los bovinos lecheros (6, 7, 11, 12, y 23).

Estos abortos pueden ser producidos por bacterias (6, 7, - 20, 21, 23, 39); por virus (11, 12, 24, 37, 46, 49, 50); por parásitos (14, 16, 51); por Chlamydia (49, 63, 68); por Rickettsia (39); así como por agentes no infecciosos (7, 28, 62); Cuadro 3.

2.5 DIAGNOSTICO.

2.5.1 Diagnóstico de laboratorio del aborto inducido por Brucella abortus (59).

En los E.U.A. el número de abortos bovinos debido a Brucella, es extremadamente bajo en el presente, debido al éxito de un programa de erradicación.

Brucella abortus es el género que más comúnmente afecta al bovino, pero otros géneros son capaces de infectarlo y pueden verse más importantes al eliminar B. abortus.

La brucelosis en el bovino está caracterizada por abortos -- después del quinto mes de gestación y una tasa alta de infertilidad subsecuente. La retención de placenta y la metritis son secuelas frecuentes del aborto. La placenta está edematosa y tiene lesiones con inflamación y necrosis. El feto es usualmente retenido en el útero de 24 a 72 hrs. después de que muere y por esta razón es común la autólisis de los tejidos. El feto no presenta lesiones específicas, sin embargo, comúnmente se puede apreciar una -- bronconeumonía supurativa. Pero por otro lado estas lesiones no -- son patognómicas, y son comunes en abortos causados por varios tipos de bacterias y hongos (59).

Al Métodos de Laboratorio.

A.1 Aislamiento de Brucella.

Los medios más comúnmente usados para el aislamiento de -- Brucella son: triptica agar enriquecido con suero*, triptica - soya agar ** y agar ALBIM Brucella***. Cuando son un problema los tejidos contaminados, se puede usar un medio selectivo (Apéndice 10). Los cotiledones placentarios, exudado uterino, contenido abdominal fetal, pulmón, hígado, hazo y meconio son buenas fuentes -- de Brucella. Se pueden molar pequeños trozos de cada tejido con -- dos o tres milímetros de solución salina estéril, hasta que se -- obtiene una solución homogénea, de la cual se adicionan 0.2 ml. a la superficie de la placa del medio agar y se dispersa el material homogéneamente sobre la superficie con una asa estéril (59).

Un método igual de efectivo para cultivar tejidos, consis -- te en sumergir el tejido en alcohol y flamearlo para secarlo, -- raspando la superficie del tejido con un bisturí o tijeras este -- rilizadas, y luego notar el tejido sobre la superficie del medio agar. Invierta la placa e incubela por lo menos cinco días a 37°C en una atmósfera con 10% de CO₂, avise el crecimiento bacteriano (59).

La inoculación de cuyes puede ser usada para aislamientos -- iniciales, pero es menos sensible que otros métodos. Consiste en inyectar un ml. de suspensión de tejidos molidos o líquidos, in -- tra-peritonealmente, cinco semanas después de la inyección colec -- te sangre y haga la necropsia del cuye, se realizan pruebas para determinar anticuerpos en la sangre, y se cultiva el hazo en me -- dios para Brucella (59).

Las colonias de Brucella, después de 5 días de incubación -- son pequeñas, circulares, convexas y translúcidas (59). Las bac -- terias Brucella son cocobacilos, gram -, que varían en talla de -- 0.5 por 0.5 a 0.5 por una micra, y están colocadas individualmen -- te. Son fijas, no esporulan, no encapsuladas, catalasa y ureasa -- +, producen H₂S, reducen los nitratos y usualmente requieren de -- la adición de CO₂ para su crecimiento, son lisadas por fagos de --

* DIFCO, Detroit Mich. ** Baltimore Biological Laboratory.

*** Pfizer Diagnostic Division, N.Y. N.Y.

Bruceella estandar y son aglutinadas por suero Anti-bruceella., su reacción oxidativa es variable y no utilizan citrato, licua la gelatina y fermentan la glucosa en medios ordinarios (59).

La descripción de las características usadas para tipificar las cepas dentro del género Bruceella se pueden obtener de "Técnicas de laboratorio para Brucelosis, O.M.S. serie monográfica No.- 55 Ginebra, 1967 escrita por G. Alton y L. Jones" (1).

Las técnicas inmunofluorescentes con controles apropiados - pueden ser usadas para examinar los tejidos fetales o placenta-- rios, estas, algunas veces proporcionan un rápido diagnóstico y superan los problemas de contaminación; sin embargo, los tejidos o líquidos deben ser cultivados para proporcionar una identificación positiva del microorganismo.

A.2) Pruebas serológicas.

Se puede realizar una prueba de tarjeta (Apéndice 11), o -- una prueba de placa o tubo (Apéndice 12). Cuando hay títulos de aglutinación a brucelosis de 1:100 o mayores en el suero de la vaca hay una evidencia absoluta de una infección y una evidencia -- presuntiva de la causa del aborto (59).

2.5.2 Diagnóstico de laboratorio del aborto inducido por Campylobacter fetus (8).

La vibriosis bovina es causada por el Campylobacter fetus - (Vibrio fetus), un miembro de la familia Spirillaceae. Han sido reconocidas dos subespecies llamadas venerealis e intestinalis. La enfermedad producida por cada una de estas subespecies es usualmente bastante diferente; sin embargo, las características morfológicas y de crecimiento de estos "vibrios" son muy similares -- (40).

La subespecie venerealis es responsable de la vibriosis genital bovina, una enfermedad venérea. Estos organismos son parásitos obligados de la mucosa de los órganos genitales en el macho y en la hembra. Hay reportes de que la enfermedad aparece únicamente en el bovino, y es caracterizada clínicamente por infertilidad temporal debido a la infección del útero, y muerte embrionaria en la gestación temprana; únicamente el aborto ocurre, ocasionalmente al final del estado de gestación. En el macho, C. fetus venere-

Neisseria infecta principalmente las criptas epiteliales y Libinia -- del prepucio, causando una ligera inflamación. Es transmitido a la hembra por coito o inseminación artificial, cuando los antibióticos no están incluidos en el diluyente del semen. En la hembra, el Campylobacter infecta la vagina anterior, cervix, útero y oviductos produciendo endometritis subaguda con infiltración linfocítica periglandular extensiva (8). Cuando un animal muere en el estado agudo de la infección (Baynes, 1975. Menciona que es posible la muerte del animal debido a viremosis), a la necropsia puede -- ser visto desprendimiento del tejido muerto y desintegración del epitelio uterino. Las vacas infectadas con C. fetus venerealis no quedan permanentemente estériles, y la fertilidad usualmente retrogresa 4 a 8 meses después de la infección inicial. Sin embargo, el organismo puede sobrevivir en el cervix durante un período de gestación completo, y posiblemente pueda infectar al feto en la cría subsecuente. La tasa de transmisión, es de cerca del 100 % entre toros infectados, novillas y vacas susceptibles; sin embargo, la tasa de transmisión de vacas infectadas a toros susceptibles -- es considerablemente más baja. La enfermedad, es considerada la causa más importante de falla reproductiva en bovinos en los EUH. Sin embargo, en los bovinos ha dejado de ser problema reproductivo dominante, debido al incremento del uso de la inseminación artificial y la adición de estreptomycin al semen (8).

Los hatos en los cuales ocurren abortos debido a C. fetus venerealis, usualmente tienen una historia de infertilidad. Sin embargo, si la infección ha estado presente por algunos años, la infertilidad será común en vacas jóvenes, y menos común en vacas viejas, muchas de las cuales han desarrollado inmunidad. Los abortos usualmente ocurren en menos de un 10 % de las vacas del hato infectado.

La subespecie intestinalis está ampliamente distribuida en la naturaleza, y es causa de abortos esporádicos en los bovinos, aborto epizootico en la oveja, hepatitis en pollo, septicemia y una variedad de enfermedades en el hombre y otros animales (8). La infección es contraída por ingestión del organismo, y en los bovinos está usualmente confinada al intestino e hígado. El organismo es raramente encontrado en los úteros no grávidos; sin em--

largo, durante la preñez puede originarse una bacteremia del intestino o hígado y originar la infección subsecuente del útero. - El organismo se localiza en los placentomas, causando placentitis y aborto en la última mitad de la gestación (8).

El C. intestinalis no produce lesiones en el feto o placenta que puedan ser distinguibles de aquellas debidas a C. fetus -- venerealis. Algunas cepas de C. fetus intestinalis parecen ser -- más virulentas para los bovinos que otras, y han sido descritos -- tres serotipos principales. a la fecha, el serotipo C ha sido encontrado causando abortos solo en ovejas, mientras que el serotipo A comúnmente está asociado con vibriosis bovina, y el serotipo B infecta a bovinos, ovinos y otros animales (8).

Los abortos debidos a cualquiera de las variedades de C. -- fetus comúnmente ocurren entre los 6 y 8 meses de gestación. Los fetos no son retenidos en el útero después de muertos, y usualmente no ocurre la autólisis anterior a la expulsión. Algunos fetos tienen los pulmones parcialmente expandidos, indicando que estuvieron vivos durante su nacimiento. La piel frecuentemente está ligeramente arrugada, sugiriendo deshidratación del cadáver; y -- puede estar presente una pericarditis, pleuritis o peritonitis -- fibrinosa. Hay aparentemente un aumento de la friabilidad del hígado fetal, ya que este órgano se rompe frecuentemente durante el nacimiento, dando como resultado una hemorragia intraabdominal extensa. La inflamación es evidente en forma confluyente al hacer -- el examen macroscópico de la placenta, y en el examen histológico de este tejido hay vasculitis, supuración y necrosis evidentes -- (8). En el examen histológico de los tejidos de los fetos abortados por vibriosis, hay frecuentemente bronconeumonía supurativa y hepatitis intersticial.

A) Método de laboratorio.

A.1) Cultivos de tejido placentario y fetales.

Los tejidos, fluidos fetales y placentarios deben ser tan -- frescos como sea posible cuando son examinados, preservados a 4°C al ser enviados para el laboratorio. Deben ser recolectados asépticamente porciones del pulmón, hazo, hígado, intestinos y líquidos del rumen y abomaso. Los tejidos deben ser molidos con arena -- estéril y solución salina, para cultivarlos en agar sangre (Apén-

dice (8).

Cuando el feto está fuertemente contaminado, o ha sido evasado, el cerebro puede ser cultivado en una forma similar y el agar sangre con antibióticos (Apéndice 8); puede ser usado para aumentar las posibilidades de aislar *C. fetus*. En el caso de fetos pequeños, deben ser cultivados el líquido amniótico y la placenta. Los placentomas deben ser esterilizados para sacar la superficie, y los tejidos subyacentes deben ser muestrados con una asea para ser inoculados (8).

Debido a que *C. fetus* es sensible a exposiciones extensas al aire, la placa de agar sangre debe ser puesta en incubación, inmediatamente después de la inoculación, y la atmósfera de la estufa debe ser ajustada a 5 % de O_2 , 10 % de CO_2 y 85 % de N_2 . Los cultivos deben ser incubados de 3 a 5 días a $37^{\circ}C$. y examinados para buscar colonias de *Vibrio* con la ayuda de un microscopio estereoscópico a 10 ó 20 aumentos usando luz reflejada. Las impresiones del abomaso y del rumen deben ser teñidas por el método de Gram y examinadas microscópicamente para buscar las colonias de *C. fetus*. Aparecen en agar sangre después de incubar por 2 a 3 días, son de 1 a 3 mm de diámetro, redondas, lisas, enteras, elevadas, translúcidas, grasosas y tienen un tinte rosáceo, pero no son hemolíticas.

En luz reflejada las colonias aparentemente tienen una composición interna de proyecciones filamentosas blancas, que se extienden hacia la periferia. Vistas por luz de transmisión las colonias de *C. fetus* que crecen en agar Brucella tellini (ABA) son de color miel, con granulación variable y exhiben una actividad pululante cuando son tocadas con una aguja.

El *C. fetus* es una bacteria Gram (-), no esporulada, con forma de bastón curvo, o bastones en coma unidos que forman espirales de 0,3 micras de diámetro, por 2 a 10 micras de largo, móvil con un solo flagelo polar. Las formas cocoides o espirales largas aparecen comúnmente en cultivos viejos, pero ciertas cepas exhiben esta característica en estados tempranos de crecimiento (8).

* Pfizer, Diagnostic division, New York, N.Y.

Una colonia aislada de Campylobacter, inoculada dentro de medio líquido de tioglicolato (Apéndice 9); inculada 3 días a --- 37°C, libre de contaminación debe ser usada como inculo para --- pruebas metabólicas diferenciales (8).

La mayoría de los Campylobacter comúnmente aislados del --- tracto genital e intestinal de los animales no son proteolíticos, y no fermentan aunque reducen los nitratos a nitritos.

La tabla 1 recopilada de varias fuentes define las características metabólicas claves usadas para distinguir las especies de Campylobacter consideradas; están incluidos Vibrio fecalis, V. coli, y Vibrios similares de los intestinos bovinos, aunque su --- identidad con respecto a su hábitat, patogenicidad y estructura --- antigénica no ha sido determinada (8).

Han sido aislados fagos específicos para V. coli y C. fetus aunque en el presente la fagotipificación no es usada en la diferenciación de los Vibrios animales. su aplicación en el futuro --- puede estar ampliamente distribuida.

Los conejos, cuyes, hamster y ratones son experimentalmente infectados con C. fetus, pero su patogenicidad es limitada. El C. fetus intestinalis puede ser diferenciado del C. fetus venerealis por su predilección hacia la vesícula biliar e intestinos de los animales inoculados experimentalmente (8).

A.2) Examen microscópico del contenido atornasal.

Deben examinarse preparaciones líquidas del contenido atornasal con un microscopio de campo oscuro o de contraste de fase para buscar Vibrios. El rápido desplazamiento, y su movimiento en forma de sacacorchos hace a estos organismos fácilmente reconocibles, pero la identificación exacta del microorganismo puede ser determinada solo después del aislamiento (8).

A.3) Prueba de suero aglutinación.

El C. fetus y los Vibrios relacionados tienen muchos antígenos complejos, y ningún método sistemático de serotipificación ha sido perfeccionado. El problema del diagnóstico serológico de vibriosis no ha sido resuelto, principalmente porque la infección con C. fetus venerealis no estimula niveles significantes de anti-

cuerpos en el suero.

La prueba de aglutinación en tubo es técnicamente muy similar a la que se emplea para diagnosticar brucelosis. Sin embargo, muchos investigadores están de acuerdo en que el título del suero no es un criterio confiable para diagnosticar vibriosis. La infección por *C. fetus pasteurii* efectivamente produce una respuesta de anticuerpos séricos ligera y variable, la cual tiene que ser diferenciada cuidadosamente de los anticuerpos inespecíficos presentes en el suero bovino normal (8).

A.4) Prueba de aglutinación de poco vaginal.

El protocolo para la prueba de "poco aglutinación" fue descrito por Kendrick en 1967, (30). El *C. fetus pasteurii* cepa H.A. fue aislado de un feto bovino en la Universidad de Wayne, y es utilizado para la producción del antígeno de tubo, es altamente estable y pertenece principalmente al serotipo O. Es efectivo para detectar aglutininas contra *C. fetus* en el poco vaginal.

Esta cepa no posee el antígeno K termolábil, y por lo tanto, produce una reacción falsa positiva ante aglutininas no específicas en el suero de bovinos normales. Al interpretar la prueba, la aglutinación completa en incluso la más baja dilución (1/25) es considerada como suficiente para un diagnóstico positivo a vibriosis. Sin embargo, es muy aconsejable que varias pocas de un mismo hato sean probadas, y que la historia del hato y el aislamiento de *C. fetus* sean considerados en la evaluación del estado de enfermedad dentro del hato (9).

A.5 Prueba de anticuerpos fluorescentes.

El conocimiento adecuado de la clasificación serológica de *C. fetus* será esencial para la aplicación difundida de la prueba de anticuerpos fluorescentes. Es conocido que el antígeno O termol estable es el principal componente en la reacción, en contraste con la interferencia causada por el antígeno K, que ocurre en la reacción de sero aglutinación. Por esta razón, un conjugado adecuado debe incluir anticuerpos contra cada uno de los tres serotipos O. La técnica para realizar la prueba de anticuerpos fluorescentes fue descrita por Mellick et al., (42).

2.5.3 Diagnóstico de laboratorio del aborto inducido por *Leptospira* (54).

Los microorganismos del género *Leptospira* causan abortos en bovinos, suinos y otros animales. Los animales silvestres y domesticados son los hospedadores naturales para los varios serotipos de leptospiros que han sido aislados de los bovinos y de los cerdos en los EUA. Aquellos serotipos que han sido aislados de los bovinos son: *L. pomona*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotumescens*, *L. putrefaciens*, *L. hardjo* y *L. seynhousiae*. Todos, excepto los tres últimos serotipos, han sido también aislados de los cerdos en los EUA. Posiblemente, cada uno de estos serotipos es capaz de causar enfermedad aguda, así como también aborto en ambos, bovinos y cerdos.

El aborto y la muerte neonatal son los signos más característicos de leptospirosis en bovinos y cerdos.

Ninguno de los signos clínicos de la enfermedad, ni las lesiones en los fetos abortados son lo suficientemente característico para hacer un diagnóstico, sin la asistencia del laboratorio en la forma de pruebas serológicas, demostración del organismo en tejidos o líquidos corporales o aislamiento del organismo (54).

Pueden ser demostrados anticuerpos específicos en el suero sanguíneo del animal afectado, usualmente alrededor del 6 día después de la infección. El título máximo es generalmente alcanzado antes de la tercera o cuarta semana después del inicio de la enfermedad. Algunos animales pueden tener un alto título de anticuerpos en el suero (1:600 o mayor), por algunas semanas o meses, y entonces el título puede disminuir gradualmente.

La prueba de aglutinación microscópica para el diagnóstico de leptospirosis (MA) es más serotipo específica que la prueba microscópica, y es el método diagnóstico recomendado. El suero debe ser probado contra los serotipos de leptospiros que se sabe están presentes en la localidad o país. El suero de bovino debiera ser probado usando los siguientes antígenos: *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. grippotumescens*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*. Los anticuerpos producidos por las infecciones con los serotipos *putrefaciens* y *seynhousiae* podrían probablemente ser detectados con el antígeno de *L. hardjo*. Hay algunas indicaciones para agregar *L. autumnalis* a las anteriores (54).

Desafortunadamente, una sola prueba serológica no discriminará entre un animal infectado y un animal recuperado. La presencia de un título de anticuerpos 1:100 o diluciones mayores (RA) - indica que el animal ha experimentado una infección por leptospi-ras en algún momento. Un aumento del título de anticuerpos medido al estudiar sueros pareados, es indicativo de una infección re-ciente, pero muchas vacas habían estado infectadas durante un tie-mpo suficiente para haber alcanzado su máximo título de anticuerpos cuando el aborto ocurre. Algunos animales infectados no desarro-llanán títulos de anticuerpos, y el probar muestras de suero de - un animal que ha abortado puede no proporcionar hallazgos conclu-yentes, pero probar todos o varios de los bovinos expuestos a la - vaca que abortó y repetir las pruebas a las 2 ó 4 semanas después puede servir para identificar los animales infectados reciente-mente y establecer si la leptospirosis está activa en el hato (54).

La vacunación no necesita ser retardada hasta el segundo - sangrado, ya que una sola dosis de bacterina, usualmente no esti-mulará la producción de un título de anticuerpos tan alto como - 1:100 (RA) en la vaca (54).

Una evidencia presuntiva de infección reciente de leptospi-ras frecuentemente puede ser obtenida de una sola muestra de sue-ro si varios antígenos de diferentes serotipos, tales como: L. -- pomona, L. grippotyphosa, L. canicola, L. hardjo y L. interrogans-~~ans~~ son empleados. La respuesta inicial de anticuerpos en - la vaca, aparentemente carecen de especificidad de serotipo, de - modo que un título pequeño contra varios serotipos puede estar - presente, y ocasionalmente el título de un serotipo heterólogo - puede exceder el título en contra del serotipo infectante; por es - ta razón, cuando ocurre una reacción en contra de varios antige-nos en la muestra de suero, esto podría corresponder a una infec-ción reciente por leptospi-ras (54).

A) Método de laboratorio.

A.1) Prueba de aglutinación macroscópica.

Los siguientes antígenos, desarrollados por Stonner y prepa-rados bajo licencia de la División de Biológicas Veterinarias de - USDA, están disponibles comercialmente: L. pomona, L. canicola, -

* Antígeno de *Leptospira*, Fort Dodge, Iowa.

L. grippotumhosa, L. icterohaemorrhagiae y L. hardjo. Cuando se usan estos antígenos con suero sin diluir, son satisfactorios para hacer una prueba tamiz, pueden ser usados, ya sea por el método de placa, o por el método de tubo con sueros diluidos para cuantificar anticuerpos en aquellos sueros que resulten positivos a la prueba tamiz (54).

A.2) Prueba de aglutinación microscópica.

Esta prueba es más específica que la prueba macroscópica. - por esta razón, es preferida por la mayoría de los laboratorios de diagnóstico, que tienen personal para producir los antígenos vivos y conducir apropiadamente la prueba.

El tiempo consumido, lo costoso de conducirla, y el uso de antígenos vivos pueden representar un riesgo para el personal del laboratorio, pero la prueba dará información muy confiable. Un procedimiento para llevar a cabo la prueba de aglutinación microscópica, se da en el Apéndice 2 (54).

A.3) Examen de campo oscuro.

Las leptospiras se tiñen muy pobremente con las tintas de anilina, y requieren ser fijadas en una forma especial, por esta razón se prefiere el microscopio de campo oscuro para examinar muestras húmedas de líquidos corporales, ya que esto elimina la necesidad de fijar y teñir.

El movimiento característico de los organismos vivos ayuda a identificarlos; todas las leptospiras son visibles a aumentos de 100 X o mayores de éste, usando un condensador de campo oscuro. Se debe tener mucho cuidado en la identificación de los microorganismos por microscopía directa; las fibrina y otros objetos similares sufren movimientos brownianos y frecuentemente son confundidos por leptospiras por observadores inexpertos (54).

Los líquidos corporales de un feto abortado deben ser examinados para buscar leptospiras, los organismos también podrían ser demostrados en los líquidos de las cavidades corporales, orina y humor acuoso del ojo. La orina de la madre de un feto abortado puede contener organismos en número suficiente para que estos puedan ser demostrados por esta técnica (54).

A.4) Inoculación de un medio de cultivo artificial.

El aislamiento de leptospiras debería ser intentado en cual

quier caso donde el material adecuado está disponible. La recuperación del organismo provee de evidencia inequívoca de infección y permite la determinación del serotipo. Cuando están siendo examinados un alto número de fetos abortados, la práctica de cultivar cada espécimen para leptospirosis es cuestionable, debido al bajo porcentaje esperado de posibilidades de éxito.

Los materiales tales como orina, humor acuoso y líquidos tejidos de sangre de las cavidades peritoneal y torácica de los fetos abortados y neonatos muertos, así como placenta fetal o líquido de placentarios deben ser inoculados en medios apropiados (54).

El diagnóstico se facilita si una muestra de orina, coleccionada asepticamente en el momento de la micción, y una muestra de sangre de la vaca acompañaron a cada feto recibido para examen. Los cultivos preparados a partir de la orina y el coágulo de sangre, es más probable que produzcan leptospirosis, que aquellos preparados del feto, ya que los organismos vivos son raramente demostrables en el feto bovino abortado. Durante el estado febril de la leptospirosis, una muestra sanguínea es el inóculo preferido para el aislamiento del organismo, mientras que más tarde, en el curso de la enfermedad, la orina es un espécimen más adecuado (54). Es esencial que los especímenes para el cultivo, o para el examen de campo oscuro sean entregados al laboratorio el día que son colectados debido a que las leptospirosis sobreviven un tiempo relativamente corto en los tejidos que sufren autólisis y en la orina.

La inoculación del medio en la granja, inmediatamente después de la colección del espécimen, es preferida si las circunstancias lo permiten (54).

Usualmente son usados pequeños volúmenes de inóculo, ya que las cantidades grandes pueden ser inhibidoras para las leptospirosis. Una o dos gotas de orina, sangre u otros fluidos, son depositados en 5 a 10 ml. de medio en tubos de rosca o viales. Los cultivos son incubados a 28° - 30°C . Una porción del medio debe ser removida con una asa de platino y examinada microscópicamente a intervalos semanales para buscar leptospirosis. Cuando no puede ser visto ningún organismo en el cultivo, después de 6 semanas de incubación, este pueda considerarse negativo.

Todas las leptospiras aisladas deben ser caracterizadas serológicamente, ya que este es el único método para establecer -- pruebas de la existencia de un serotipo particular en una especie animal*.

Deben ser preparados cultivos dobles de cada inóculo, en el siguiente medio:

1.- Medio de Fletcher semisólido, conteniendo 10 % de suero de conejo ligeramente hemolizado (Apéndice 3), o medio de Stuart (Apéndice 4).

2.- Medio semisólido de polisorbato y albúmina bovina (Apéndice 5), o medio preparado comercialmente, ligeramente modificado; medio base leptospiridico con enriquecimiento EMJH¹. Un análogo -- del unacil, el 5-fluorouracil, puede ser adicionado a uno o a ambos de los medios mencionados anteriormente para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes (Apéndice 6).

A.5) Inoculación animal.

Cuando se sabe que está presente una contaminación bacteriana, deben ser inoculados hamsters, chinchillas, jerbos y cuyes -- jbs -- pesando 300 gr. o menos. Deben ser inoculados intra-peritonealmente con 1-2 ml. de sangre, orina u otro material (54). Los hamsters son preferidos por muchos investigadores, y los cuyes -- son los menos susceptibles de los animales mencionados. Deben ser tomada diariamente la temperatura corporal del animal inoculado, y colectada asepticamente una muestra de sangre mediante punción cardiaca al primer día de pirexia y en los 2 siguientes días. Si no es registrado un incremento de la temperatura de 0.5° día post inoculación, se debe de tomar una muestra de sangre, otra el 7° día, y una más en el 11° día. La sangre completa, obtenida del animal de laboratorio, debe ser usada para inocular medios de cultivo (ver sección A.4). (54).

* Para la serotipificación de cualquier aislamiento, se puede contactar al Dr. J. Torres B. (UARN), o se pueden enviar las muestras al Center for Disease Control, Bacterial & Immunologic Section -- attn. Leptospira Division, Building 4, Room 337, 1600 Clifton -- road, N.E., Atlanta, Georgia 30333. ¹ DIFCO, Detroit, Michigan.

A.6) Examen microscópico de secciones de tejido.

Los tejidos apropiados para examen microscópico son: riñón, hígado, glándula adrenal y membranas fetales. La tinción de Levan-diti es la preferida para la demostración de leptospiras.

Las técnicas de FA han sido usadas para demostrar leptospiras en tejidos fetales (54), teniéndose cuidado para hacer controles apropiados con la técnica FA, ya que, las leptospiras tienden a perder sus características morfológicas en los tejidos, especialmente en aquellos que sufren descomposición; entonces los organismos tienden que ser reconocidos en base a la fluorescencia solamente. Tiene que ser eliminada la posibilidad de fluorescencia inespecífica.

La demostración de leptospiras en los tejidos provee evidencia inequívoca de la presencia del organismo, pero falla para identificar definitivamente el serotipo y para establecer una relación entre la presencia del organismo y la enfermedad (54).

2.5.4 Diagnóstico de laboratorio del aborto inducido por Listeria monocytogenes (61).

Listeria monocytogenes es una bacteria aparentemente ubicua, que afecta primariamente a los rumiantes, y que puede producir: 1) Encefalitis y movimientos circulares en los adultos; 2) Septicemia en fetos y neonatos. En los animales gestantes, el organismo parece tener una predilección por tejidos feto placentarios, especialmente durante el último trimestre de la gestación, y puede ser responsable ya sea de abortos esporádicos o de abortos múltiples.

La historia frecuentemente revela que los bovinos están siendo alimentados con silo echado a perder. Dicho silo puede tener un pH alcalino, el cual puede incrementar la multiplicación de L. monocytogenes. Una multiplicidad de casos clínicos aparecen probablemente después de la exposición del ganado a una fuente común (por ejemplo ensilado), más bien que al contacto directo con animales infectados.

Los fetos infectados con L. monocytogenes, pueden morir y ser retenidos en el útero de 24 a 72 horas antes de ser expulsados. Aquellos fetos afectados cerca de término, pueden ser alor-

tados poco después de la muerte, o incluso, pueden nacer vivos pero débiles (61).

Las vacas que abortan a causa de L. monocytogenes, frecuentemente tienen fiebre antes, durante o después del aborto. La placenta es retenida frecuentemente y puede haber descargas genitales purulentas que pueden persistir de 2 o 3 semanas después del aborto.

La marcada autólisis usualmente presente en los materiales abortados puede enmascarar las lesiones de hígado y placenta. Algunas veces puede estar presente una pericarditis o peritonitis fibrinosa. Frecuentemente están presentes en el hígado, en los cotiledones o en ambos, focos blancos de hasta 1 cm. de diámetro. En las superficies serosas o mucosas de varios órganos se ha descrito la presencia de hemorragias. De estas lesiones, los focos en el hígado son probablemente los más significativos, pero ninguna de estas lesiones es patognomónica (61).

Histológicamente pueden ser detectados focos necróticos microscópicos en el hígado, no obstante los cambios autolíticos. Las secciones de tejido teñidas con Gram, mostrarán bastones positivos, con las características morfológicas de L. monocytogenes asociados con los focos necróticos. Las placentomas tendrán cambios necróticos similares, con una reacción inflamatoria principalmente confinada en las carúnculas. El examen de secciones de cotiledón teñidos con Gram puede revelar numerosas bacterias en el epitelio o mesénquima de las vellosidades del corion. Los organismos pueden estar presentes en colonias densas o dispersas --- (61).

Otras infecciones bacterianas o virales, pueden producir lesiones similares en el hígado fetal, por esta razón, la demostración de bacterias con características morfológicas típicas de L. monocytogenes son importantes en la diferenciación (61).

La sangre fetal, pulmón, hígado, riñón, cerebro y tejidos placentarios así como líquidos del estómago, pleural y peritoneal pueden ser cultivados en agar triptosa (Apéndice 7), o agar sangre*, con 5 % de sangre desfibrinada de ovino o de bovino (61). El contenido del abomaso fetal es una buena fuente de microorganismos, y usualmente tiene menos microorganismos contaminados o -

* DIFCO, Detroit Mich.

comensales que otros especímenes fetales (61).

Las placas pueden ser inculadas aeróbicamente, pero es preferida una atmósfera conteniendo el 10 % de CO_2 . L. monocytogenes aparece en forma de pequeñas colonias, ligeramente hemolíticas -- después de únicamente 24 horas de incubación (61).

Cuando el organismo crece en agar nutritivo, y las colonias son vistas con luz que pase a través de la placa en dirección oblicua, las colonias aparecen de color azul claro. Cuando L. monocytogenes es inoculada en medios para probar motilidad, produce una figura típica semejante a una sombrilla cerca de la superficie del medio después de 18 a 20 horas de incubación. La evidencia de la motilidad puede aparecer más tempranamente si el cultivo se mantiene a temperatura de laboratorio, que si es incubado a -- 37°C .

L. monocytogenes es catalasa positiva, produce una rápida reducción de la leche tornasol, produce ácido pero no gas a partir de la dextrosa, lactosa, maltosa y sucrosa. No licúa la gelatina, no reduce los nitratos no produce ácido ni gas a partir del manitol o dulcitol (61).

Hay conjugados inmunofluorescentes para los serotipos 1 y 4b, disponibles comercialmente, y son específicos de serotipo. Las colonias de cultivos primarios pueden ser teñidas con ambos conjugados, y frecuentemente pueden ser identificadas en lo referente a su serotipo. Para demostrar la presencia de L. monocytogenes, se pueden hacer impresiones del hígado, de los cotiledones fetales, o impresiones de los tejidos homogeneizados; se deben usar controles positivos y negativos. La tinción de contraste de Negro de ericromo o de rodamina, es útil para reducir la fluorescencia no específica cuando las improntas o las secciones de tejidos son teñidas. A menudo, se ha logrado el aislamiento de L. monocytogenes haciendo cultivos de los tejidos homogeneizados, mantenidos a 4°C por algunos días o meses, no obstante que al hacer cultivos de los tejidos originales no hubo ningún resultado. Este procedimiento, sin embargo, parece innecesario cuando son cultivados especímenes feto placentarios, probablemente debido al al

* DIFCO, Detroit, Mich.

** Baltimore Biologics Laboratory, Baltimore, Md.

to número de bacterias presentes comúnmente en estos materiales - (61).

La L. monocytogenes inoculada dentro del saco conjuntival - del conejo produce conjuntivitis supurativa, y cuando se inocula subcutáneamente en ratones, produce focos necróticos en el hígado. Sin embargo, usualmente la identificación es posible sin recurrir a la inoculación animal (61).

2.5.5 Diagnóstico de laboratorio del aborto inducido por Corynebacterium pusillum (60).

C. pusillum es el germen piloso más frecuentemente aislado a partir de los rumiantes, y está frecuentemente involucrado en infecciones del sistema reproductivo de ambos sexos. Es un habitante común de la mucosa nasal, conjuntival y preputial de bovinos clínicamente normales. Sin embargo, C. pusillum no está presente como contaminante o comensal en los tejidos de fetos abortados o placentas, y cuando es encontrado ahí, su presencia es significativa, siendo la mayoría de los abortos en el último tercio de la gestación (60).

Se cree que el C. pusillum llega al útero por una ruta hematológica para producir una placentitis supurativa, particularmente en la carúncula y el endometrio adyacente. La muerte fetal puede ser causada por hipoxia e inanición, siguiendo a ello la destrucción placentaria. Se han encontrado algunos organismos en los bronquios fetales, pero, probablemente se encuentran ahí por la aspiración del líquido amniótico contaminado; sin embargo, el feto podría presentar una septicemia debida a una transmisión transplacentaria (60).

Frecuentemente están presentes cambios autolíticos en el feto y la placenta, pudiendo estar presentes también una pericarditis, pleuritis o peritonitis fibrinosa (60).

En los casos de campo, los cotiledones bovinos frecuentemente contienen colonias diseminadas de C. pusillum, que se muestran como cocobacilos Gram + a la tinción de Gram, siendo la placentitis purulenta una lesión consistente pero no patognomónica. En ovejas gestantes infectadas experimentalmente C. pusillum pro-

duce una placentitis supurativa, la cual es más aparente en los placentomas intactos, también ocurre una bronconeumonía supurativa fetal que contiene colonias de *C. pyogenes*, pero no es tan común como la placentitis supurativa (60).

La placenta es el espécimen del cual el microorganismo es más consistentemente aislado, pero el contenido stomasal usualmente tiene menos contaminantes y organismos comensales que otros especímenes. La sangre fetal, pulmón, hígado, riñón, cerebro, tejidos placentarios, estómago y líquidos pleural y peritoneal pueden ser cultivados en agar lactoso o en agar a base de sangre, con 5 % de sangre de ovino o bovino desfibrinada, a 32°C, en una atmósfera con 10 % de CO₂ (Apéndice 7).

El *C. pyogenes* es frecuentemente reconocible por sus características celulares y su morfología colonial. Es pequeño Gram +, no móvil, con forma de bastón irregular, el cual en agar sangre forma pequeñas colonias hemolíticas similares a las de los *Streptococcus*. Es catalasa positivo y licua la gelatina si se le da suficiente tiempo. Su actividad en leche tomanol varía un poco, pero ordinariamente produce ácido a partir de: dextrosa, maltosa, lactosa y sucrosa, no produce ácido a partir del manitol o dulcitol, no reduce los nitratos ni produce indol (60).

El *C. pyogenes* tiene grado de dependencia variable hacia la sangre o suero, su habilidad para adaptarse a crecer en medios artificiales y la cantidad de tiempo necesario para que produzca reacciones, también es variable. Pequeñas colonias hemolíticas pueden ser aparentes en 24 horas, ocasionalmente áreas de débil, pero completa hemólisis de la sangre pueden ser la única indicación macroscópica de que el crecimiento está presente.

Para ver las diminutas colonias, la placa debe ser examinada microscópicamente, o con una lupa y luz reflejada. Comúnmente se pueden encontrar bacterias solas o en grumos con sus extremos en forma de punta o engrosada con apariencia similar a la de los *Streptococcus*. *C. pyogenes* puede ser distinguido de los *Streptococcus* en agar manitol, en el cual creberán los *Streptococcus* pero no el *C. pyogenes*. Frecuentemente son aisladas cepas, las cuales son totalmente dependientes de la presencia de sangre o suero y se hacen subcultivos adicionales con similar facilidad; sin em-

largo, algunas cepas requieren la adición de unas pocas gotas de suero estéril al medio de crecimiento. La adición de suero acidifica ligeramente este medio, y es por lo tanto necesario comparar el medio inoculado, con un medio de carbohidratos no inoculados, - al cual se le agrega suero para determinar si hubo fermentación - (60).

2.5.6 Diagnóstico de laboratorio del aborto inducido por varias especies de bacterias (35).

Muchas especies bacterianas de amplia y variada patogenecidad para el ganado bovino han sido asociadas con abortos. Incluidas en este grupo están: Escherichia coli, Bacillus spp., Serratia marcescens, Pseudomonas spp., Coccidia asteroides, Streptococcus spp., Alcaligenes fecalis, Pasteurella, Pseudotuberculosis, Salmonella spp., Aeromonas hydrophila y Streptococcus spp (35).

Muchos de estos organismos son bastante ubicuos y no están generalmente asociados con enfermedad en el ganado bovino adulto. En tales casos, la mera presencia del organismo en tejidos de un feto abortado no puede ser considerada evidencia absoluta de que el microorganismo causó el aborto. Algunos organismos como E. coli, Bacillus spp., y Streptococcus alfa hemolyticus, son comúnmente aislados de tejidos y contenido abomasal de los fetos abortados, mientras que existen evidencias de que ellos son capaces de causar abortos en el ganado bovino, ciertamente ellos no están involucrados en la mayoría de los casos de donde fueron aislados -- (35).

Ocasionalmente bacterias consideradas no patógenas o ligeramente patógenas para el bovino o bacterias conocidas por causar enfermedades diferentes al aborto en el bovino, son aisladas de los tejidos de fetos abortados. En estos casos, la inoculación de vacas gestantes susceptibles es el único medio de probar la capacidad abortígena de dichos organismos. Ya que esto no es un procedimiento ordinario de diagnóstico, ciertos criterios pueden ser usados para intentar establecer si la presencia de dichos organismos en un feto abortado es significativa.

Los criterios sugeridos son los siguientes:

A) El organismo es encontrado en un número razonablemente alto y

en cultivos puros o casi puros, en el contenido alomusal fetal, - en los tejidos fetales o en ambos.

A.1) Están presentes lesiones de inflamación en los tejidos fetales (las lesiones más comunes son neumonías y placentitis).

A.2) No se encuentra otra causa probable productora de abortos.

Obviamente satisfacer estos criterios no provee de ninguna prueba absoluta de que el organismo aislado causó el aborto, pero provee de una evidencia razonable sobre la cual basar el diagnóstico presuntivo. Considerando el tercer criterio se tiene que reconocen que las infecciones mixtas probablemente sean también causas de aborto (35).

2.5.7 Diagnóstico de laboratorio del aborto epizootico bovino --- (32).

La etiología y medios de transmisión del aborto epizootico-bovino (EBA), están todavía por establecerse. En la Universidad - de California, se ha estado estudiando la enfermedad durante los últimos 20 años. En la primera literatura de California y otras - partes del mundo hay referencias de condiciones similares; sin embargo, al presente, el conocimiento de la enfermedad resulta casi enteramente del trabajo en dicha universidad; por esta razón, la etiología y la transmisión son descritas en forma incompleta, dando lugar a una variación considerable en la interpretación de la información disponible (33).

Una *Chlamydia*, la cual fue aislada de fetos abortados, produjo abortos cuando fue inoculada en vacas gestantes; este organismo ha sido aceptado como agente etiológico de EBA. Algunos progresos recientes, mencionados después hacen esto cuestionable. El EBA ocurre repetidamente en las montañas y laderas de California. Los bovinos mantenidos en pastos irrigados y mejorados, raramente experimentan la enfermedad, mientras que aquellos que pastorean - en las cercanías o en los pastos nativos de las laderas, frecuentemente abortan. Las vacas gestantes, expuestas a la enfermedad - en las laderas, cuando son transportadas a otros lugares mejorados, abortan varias semanas después; esta y otras características indican que la enfermedad fetal es crónica (32).

Los abortos usualmente ocurren en el último tercio de la --

gestación. Ocasionalmente algunas vacas lecheras son pastoreadas en forma similar al ganado de carne, en el cual, debido a los empadres estacionales, la mayoría de los abortos ocurren durante el verano alrededor del Valle Central de California, y durante el invierno en el área de las altas montañas. Las vacas viejas no son más resistentes a EBA que lo que lo son las jóvenes. Sin embargo, las vacas raramente abortan más de una vez debido a esta enfermedad. La incidencia de abortos por EBA es más baja en los animales criados donde la enfermedad es enzootica que en otros bovinos llevados a dicha área, pudiendo abortar alrededor del 80 % de los bovinos importados (32).

El diagnóstico se hace en base a la historia, signos clínicos y lesiones fatales. Los fetos afectados por EBA, usualmente mueren en el momento del aborto, y no hay autólisis postmortem previa a la expulsión. Hay hemorragias petequiales en la conjuntiva y en las mucosas oral y nasal. El enrojecimiento del morro es especialmente notorio en terneros de cara blanca y es característico de la enfermedad. También puede haber dermatitis, y puede ser necesario separar el pelo de los fetos para poder ver esta lesión. Los fetos infectados, expulsados a término, pueden llegar a sobrevivir. Las lesiones corresponden a las de una enfermedad cárbica, con hiperplasia retículo endotelial difusa, hemorragias en muchos órganos. Los tejidos linfoides de todo el cuerpo están aumentados y pueden tener hemorragias petequiales. Hay una acumulación de líquido color paja en las cavidades corporales, la cual en algunos fetos puede causar distensión de abdomen. En algunos casos hay una marcada nodularidad congestiva del hígado, esto resulta de la estasis vascular, la necrosis y la hiperplasia retículo endotelial (32).

El examen microscópico del hazo y los nódulos linfoides, revela hiperplasia retículo endotelial. Las lesiones mencionadas -- hasta ahora, ocurren en los casos de campo, así como también en aquellos producidos experimentalmente con *Chlamydia*.

En los casos de campo hay una marcada depresión linfoides de los nódulos del timo, junto con hemorragias en su superficie e hiperplasia retículo endotelial de la porción medular de los bazoos, este hecho ha causado algunas dudas con respecto de la signi-

significancia etiológica de las Chlamydias (32).

El conocimiento de la participación de las hormonas adrenocorticotrópicas en la iniciación del parto, hace postular que EBA a través del "stress" causa hiperplasia de la corteza adrenal fetal y de esta manera inicia un parto prematuro. Esto podría explicar el estado fresco del feto (32).

Como se esperaba en una enfermedad como esta, hay una elevación de Ig Gs e Ig As en el suero fetal. Los fetos de los brotes de campo de EBA tienen un elevado nivel de inmunoglobulinas (Ig Gs 3.0 mg/ml. aproximadamente), y no tiene anticuerpos específicos fijadores del complemento para Chlamydias.

Los fetos abortados por vacas inoculadas con Chlamydias, tienen niveles elevados de inmunoglobulinas (Ig Gs = 2.0 mg/ml. aproximadamente), y tienen anticuerpos específicos fijadores del complemento para Chlamydias, este hecho incrementa la duda de la significancia etiológica de la Chlamydia en el EBA (32).

El aislamiento de Chlamydia de fetos abortados de vacas inoculadas experimentalmente es relativamente fácil, por otra parte, este agente es raramente aislado de casos de campo, a pesar del uso de técnicas refinadas. El aislamiento de Chlamydias no puede ser considerado como un procedimiento satisfactorio de diagnóstico de rutina de los casos de abortos en condiciones de campo. El examen serológico de la hembra abortada no ha sido de valor diagnóstico (32).

En California se tiene razonable confianza en diagnosticar esta enfermedad en la base de la localización geográfica, historia y lesiones fatales. Considerando que no se conoce el agente etiológico, y la extensa experiencia de un gran número de veterinarios de la Universidad de Davis en California, se puede considerar que dicha enfermedad solo ocurre en California y zonas adyacentes (32).

2.5.8 Diagnóstico de laboratorio del aborto inducido por el virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) (34).

Los abortos por virus de IBR, frecuentemente ocurren como abortos en cascada (alto número de abortos simultáneamente) (5), en hatos de ganado productor de carne, en los que se puede llegar

a observar de un 5 % hasta un 60 % de vacas abortadas. Esto puede ser más esporádico en hatos productores de leche. Los abortos ocurren más comúnmente 4 meses antes de que termine la gestación, y frecuentemente no es notado ningún otro signo de IBR en las vacas infectadas (34).

Los fetos abortados debido a IBR, mueren usualmente dos o más días de su expulsión, y ocasionalmente, están parcial o completamente momificados (34). Los órganos viscerales están teñidos uniformemente de rojo oscuro, debido a la inhibición de los pigmentos sanguíneos y están presentes en la cavidades corporales líquidas teñidas de sangre. Hay lesiones macroscópicas inespecíficas en los tejidos fetales y placenta (34).

A) Método de laboratorio.

A.1) Examen histológico

La típica lesión microscópica de los tejidos fetales es necrosis focal, y su presencia es bastante específica para la enfermedad. La lesión puede ser encontrada en el hígado, pulmón y riñón, pero es observada mejor, y ocurre con mayor consistencia en el hígado. A pesar de la extensiva autólisis de las vísceras, esta necrosis focal ante mortem es claramente distinguible de los cambios que ocurren post mortem. Las lesiones que hay son bastante similares (ocasionalmente) a las que ocurren en fetos abortados debido a listeriosis; sin embargo, en ausencia de otros agentes infecciosos demostrables, la presencia de tales lesiones indica la probabilidad de que el virus de IBR este involucrado en los abortos.

Las lesiones de IBR son menos consistentes en la placenta, y algunos patólogos creen que no ocurren estas; otros describen una placentitis necrótica focal, con cambios similares a aquellos que ocurren en otros tejidos (34).

A.2) Prueba de anticuerpos fluorescentes.

Un medio específico y exitoso para diagnosticar aborto por IBR, es la técnica de anticuerpos fluorescentes (FA), aplicada a secciones de tejido fetal congelado y previamente cortado en un criotomo (Apéndice 1). El riñón y la glándula adrenal fluorescen más consistente e intensamente, y por esto, son los tejidos prefe-

ridos para el examen FA. La fluorescencia ocurre, pero con menor regularidad en el pulmón, hígado, tiro y bazo. La fluorescencia también ocurre bastante consistentemente en la parte central de las vellosidades de las placentas infectadas, pero la autofluorescencia de los tejidos autolizados hace que la interpretación sea bastante difícil. La tinción de contraste de alúmina marcada con rodamina, ayuda enmascarando algunos de la fluorescencias no específicas, pero también puede reducir la intensidad de la fluorescencia específica.

Serán encontradas células individuales con intensa fluorescencia del núcleo y citoplasma dispersas a través del tejido naranquimatoso, especialmente del hígado, esta fluorescencia no es específica ocurre en tejidos teñidos con conjugado de globulinas bovinas normales, como también, en aquellas teñidas con conjugado de globulinas anti IBR (34).

A.3) Aislamiento del virus,

Cuando el único espécimen disponible de una vaca que ha abortado es la placenta, intentar el aislamiento del virus es recomendable, porque la interpretación de los resultados de la técnica FA, aplicados a la placenta pueden ser difíciles, y las lesiones histológicas en este tejido son inconsistentes. Cuando el pulmón fetal, hígado, bazo y riñón, están disponibles para histología y examen de fluorescencia, el intentar el aislamiento del virus, probablemente no aumentará el número de diagnósticos de IBR realizados. El virus es aislado en menos de uno de cada tres especímenes de abortos por IBR, y entonces, es aislado más frecuentemente de la placenta (34).

Los cultivos de células de riñón de embrión de bovino ---- (BEK), son satisfactorios para el aislamiento del virus de IBR. Dependiendo del número de partículas virales viables presentes en el inóculo, el efecto citopático (CPE), ocurrirá en el monoestrato de BEK en 24 hrs. a siete días después de la inoculación. Cuando el CPE no ocurre dentro de los 7 días, las células BEK deben ser congeladas, descongeladas, cosechadas y pasadas a un monoestrato fresco. El resultado puede ser considerado negativo para IBR si no ocurre CPE después de los 7 días de incubación del segundo pase.

Cuando el CPE ocurre en el monoestrato BEX, la presencia -- del virus IBR, puede ser confirmada por el carácter de los cam-- bios en los monoestratos celulares, y más específicamente por la técnica FA aplicada a cultivo de tejidos (34).

A.4) Examen serológico.

Cuando los productos del aborto no están disponibles, la -- prueba de seroneutralización (SN), en muestras de sueros pareados de la hembra abortada, puede ayudar a determinar si IBR está involucrado. La primera muestra de suero debe ser tomada cerca del -- tiempo del aborto, y la segunda de 10 días a 2 semanas después. -- Un incremento de 4 diluciones o más en el título SN del segundo -- muestreo comparado con el primero, da una buena evidencia de una -- infección reciente por IBR. Esto proporciona evidencia presuntiva de que IBR causó el aborto.

Las vacas que han abortado debido a IBR, usualmente han sido infectadas por el virus cuando menos 2 semanas y ocasionalmente hasta 4 meses antes del aborto. Tales vacas usualmente tienen un título significativo de SN al tiempo del aborto. Sin embargo, -- hay evidencia de que el virus liberado dentro de los sistemas de la vaca durante el aborto, puede causar una respuesta secundaria de anticuerpos. Así incluso, las vacas infectadas algunas semanas antes del aborto podrían tener un aumento significativo del título de anticuerpos siguiendo el aborto.

Generalmente el examen del feto provee un diagnóstico más -- definitivo y rápido, y es preferido a los procedimientos serológicos (34).

2.5.9 Diagnóstico de laboratorio del aborto inducido por diarreaviral bovina (BVD) (31).

El virus de BVD es una causa ampliamente reconocida de aborto. La información presente, en contraste a la literatura de hace 10 - 15 años, indica que la incidencia de abortos por BVD no es -- alta en E.U.A. El diagnóstico de abortos por virus de BVD, ordina -- riamente no es posible a través del aislamiento del virus de BVD -- a partir del feto, o el reconocimiento de lesiones específicas de BVD en el mismo. En la mayoría de los casos, nosotros debamos con -- formarnos con evidencias circunstanciales de que la enfermedad --

existía en el feto, antes de que ocurrieran los abortos (31). El diagnóstico puede ser ayudado ocasionalmente por el reconocimiento de lesiones específicas en el feto y por el aislamiento del virus del feto. Sin embargo, hay evidencias de que en algunos casos la enfermedad en el feto podría ser demasiado leve como para causar aborto. En esos casos, el virus de BVD puede ser aislado de un feto abortado, cuando el aborto en realidad fue debido a otro agente.

La enfermedad en el feto, debida al virus de BVD, es independiente de la condición de la hembra. Sin embargo, el feto de una vaca inmune a BVD, está protegido de la infección natural. La infección fetal puede ser causada por inoculación del feto, o cuando ocurre una infección natural o experimental en la hembra, que origina una viremia, la cual cruza la placenta. Hay evidencia que indica que durante el estado de viremia, el virus puede cruzar la placenta a partir del día 53 y hasta el séptimo mes de gestación. Una vaca inoculada en el día 50 de la gestación, padeció la enfermedad, esto indicado por la aparición de anticuerpos neutralizantes del virus, pero no ocurrió la infección fetal (31). La evidencia sugiere que la fijación de la placenta (la cual ocurre aproximadamente a los 35 días de gestación), tiene que ocurrir antes de que el virus de BVD pase al feto.

El efecto del virus depende de la edad fetal: durante el primer trimestre y hasta cierto grado durante el cuarto mes, el feto infectado por el virus de BVD, sufre una severa enfermedad y en muchos casos muere.

En la experiencia del doctor Kendrick, la mayoría de los fetos enfermos son abortados; sin embargo, en este estudio es fácil que el aborto ocurra y no sea observado.

En dicho experimento, la temperatura rectal de la vaca se determinó diariamente, y fueron examinados por vía rectal 2 veces a la semana. Algunos de estos animales abortaron sin evidencia aparente, y lo único que se encontró al hacer el examen rectal, fue que tenían el útero vacío. En un caso, ocurrió momificación fetal (31).

Los fetos infectados durante el segundo trimestre, usualmente sobreviven a la infección, pero pueden desarrollar defectos le-

patológicos en el cerebro, piel y bronquiolos, debidos a la necrosis de los tejidos en desarrollo. Las lesiones inflamatorias fetales son leves, y casi siempre afectan principalmente a los vasos sanguíneos, y hasta cierto grado, la placenta. El defecto más comúnmente observado es la hipoplasia cerebral, la cual puede estar asociada con defectos de la retina (31). Kendrick (1975), observó un caso de alopecia parcial, aparentemente debida a una dematilis necrótica fetal. La hipoplasia pulmonar, no ha sido asociada con esta infección; sin embargo, ocurre en terneros recién nacidos, posiblemente como resultado de la necrosis de los bronquiolos por el virus de BVD. Los fetos sobrevivientes a la infección, tienen un nivel alto de anticuerpos al momento del nacimiento y antes de ingerir colostro (31).

Los fetos afectados durante el último tercio de la gestación, sufre una ligera enfermedad, de la cual, como regla general se recuperan completamente. Estos fetos tienen un alto título de anticuerpos en el momento de nacer, y antes de ingerir el colostro.

Los anticuerpos seroneutralizantes en los recién nacidos son el resultado de la inmunidad activa, la cual, puede ocurrir después de que el ternero obtiene competencia inmunológica para este virus, aproximadamente a los 180 días de gestación. En vacas infectadas *in útero*, antes del día 180 de la gestación, aparentemente la infección permanece crónica hasta que el ternero se vuelve competente para producir anticuerpos contra BVD. Los terneros que sobreviven a este punto, produce anticuerpos y ordinariamente eliminan el virus. El virus ha sido aislado de muchos terneros infectados *in útero*, y recuperados antes del parto; sin embargo, el virus no ha sido aislado de fetos a término, con anticuerpos activos contra el virus (31).

Las lesiones que ocurren en fetos infectados, y abortados tempranamente en la gestación, son descuidadas, son probablemente de pequeña significancia práctica para el diagnóstico. Las lesiones que ocurren en fetos infectados a la mitad de la gestación son distintas, pero lo suficientemente ligeras para que el feto usualmente sobreviva. La necrosis en el cerebro, la piel y los bronquiolos pueden conducir a defectos teratológicos. Las lesio-

nes debidas a inflamación, que usualmente son moderadas y localizadas, están principalmente limitadas al sistema vascular. La vasculitis se extiende a la placenta, en donde ocurre una inflamación caracterizada por la presencia de células mononucleares (31). La hiperplasia retículo endotelial ocurre hacia el cuarto mes, y es especialmente aparente en los espacios porta del hígado. En los nódulos linfoides, también hay evidencias de la estimulación antigénica (31).

Existen varias opciones, las cuales pueden ser usadas individualmente o en conjunto, reconociendo que usualmente no se puede diagnosticar la enfermedad con base en el examen patológico o virológico del feto y la placenta; ya que si se aísla el virus del feto o la placenta, se tendrían que hacer estudios para determinar si este virus es patógeno o apatógeno.

La presentación de una enfermedad fetal en el feto, seguida por la aparición de anticuerpos neutralizantes BVD, en animales anteriormente negativos, o un incremento de d a f diluciones dobles en el título de anticuerpos, indica la presentación de BVD en el feto. Esto es una evidencia de que el aborto pudo haber sido causado por esta infección. La presentación de defectos teratológicos característicos, y de anticuerpos seroneutralizantes en el feto, o en los recién nacidos que aún no han recibido calostro son otras evidencias de que esta enfermedad se presentó en el período fetal. Los tejidos de los fetos abortados deben ser examinados mediante técnicas virológicas o histopatológicas. Como se mencionó anteriormente, el aislamiento del virus es raro, y usualmente no es posible encontrar lesiones suficientemente claras en los fetos autolizados presentados para el diagnóstico. Cuando se encuentran evidencias de estimulación antigénica mediante los estudios serológicos se tendrán indicaciones de una infección fetal - (31).

2.5.10 Diagnóstico de laboratorio del aborto inducido por Tricho- monas foetus (39).

La tricomoniiasis es una enfermedad venérea contagiosa del ganado bovino caracterizada por esterilidad, aborto, y piometra - (48). Causada por el parásito flagelado Tricho-
monas foetus, el

aborto y la piodieta son frecuentemente los primeros signos de tricomonirosis notados en el hato, pero, ocurren en relativamente pocos animales. La esterilidad es el más prevalente y dañino de los signos, ocurre en un alto porcentaje de los animales en un hato infectado recientemente. Durante el período de infertilidad la duración del ciclo estral puede variar de lo normal. Las novillas son consideradas usualmente como las más susceptibles, sin embargo, la inmunidad no aumenta con la edad, pero, se crea por la exposición. La infección está confinada al tracto genital, y generalmente la transmisión es a través del contacto sexual. La difusión de la enfermedad en establos que utilizan la I.A., se presume que ocurre a través del contacto del pene o del pelo del toro marcador con el trasero, o con el escudo del animal usado como engaña para la monta el cual ha sido contaminado previamente por un contacto similar por un animal infectado. Con esta excepción las medidas de control pueden estar basadas en asumir que la transmisión es a través del coito (33).

La aparición de los síntomas previamente mencionados, usualmente seguidos a la introducción de un animal en el hato, da causa para sospechar ya sea de tricomonirosis o de vitriosis. En el caso de tricomonirosis el diagnóstico descansa sobre el aislamiento y observación del organismo en por lo menos un animal del hato. Ninguna otra prueba es satisfactoria para la detección de tricomonirosis. En los fetos abortados pueden ser encontrados muchos microorganismos en los líquidos placentarios y en el contenido alomasaal. Ocasionalmente aparecen en los pulmones y sangre del cráneo del feto. También están presentes en el útero durante algunos días después del aborto, y pueden ser vistos poniendo estos líquidos en un porta objeto y observándolos microscópicamente.

La mayoría de los abortos debido a *L. foetus* ocurren en la primera mitad de la gestación, aunque se han reportado abortos en el séptimo mes (33). Las membranas fetales pueden ser expulsadas con el feto o retenidas. En el último caso usualmente resulta una endometritis catarral crónica o purulenta, y las vacas afectadas pueden volverse estériles debido a la destrucción de la mucosa uterina (33).

Observación del Microorganismo.

Se cubre la mitad de un portaobjetos con fluido de la placenta o contenido atomasal. Sin usar cubreobjetos, se puede examinar una cantidad relativamente grande de líquido en un tiempo breve. - Las Tritrichomonas foetus tienden a migrar hacia abajo en el líquido de modo que usando ampliificaciones de 100 X, el microscopio es enfocado justo encima de la superficie del vidrio. Cualquiera objeto que se mueva es examinado cuidadosamente enfocado hacia arriba y hacia abajo hasta que sea visto claramente.

El organismo puede ser identificado a 100 X con base a su tamaño, forma y movimientos característicos causados por el movimiento del flagelo y la membrana ondulante; sin embargo, las características distintivas, tales como el flagelo y la membrana ondulante son claramente visibles únicamente a mayor aumento (500X). Usando el mayor aumento pueden ser vistos los tres flagelos anteriores, y el movimiento constante similar a una espiral de la membrana ondulante. Las Tritrichomonas muertas pierden rápidamente su forma, y se vuelven indistinguibles de cualquier desecho que este presente, por esta razón muertas son casi imposibles de identificar por examen directo.

Si es diagnosticado un aborto por T. foetus, el hato entero de donde proceda debe ser considerado como posiblemente infectado. Mientras que todavía pueden existir algunas dudas en lo que se refiere a cuales son las vacas infectadas, es casi seguro que el toro este infectado.

Debido a que el aborto es raro en hatos infectados con T. foetus es necesario examinar frecuentemente a a las vacas, y más frecuentemente a los toros. Algunos procedimientos para coleccionar especímenes de vacas y toros han sido descritos, para cuando la historia del hato indica la posible presencia de la infección --- (16).

Ya que usualmente están presentes un alto número de organismos en el líquido placentario y el contenido atomasal de los fetos abortados a tricomonirosis es raramente necesario cultivar --- los especímenes para poder demostrar la presencia de Tritrichomonas. Sin embargo, el hacer examen de cultivos de fluidos uterinos aumenta grandemente la eficacia del diagnóstico. Un medio apropiado para el cultivo de Tritrichomonas foetus es dado en el Apéndice

ce 13 (33). Ninguna lesión fetal macroscópica o microscópica es específica para Taeniaichomonas foetus. El diagnóstico está basado casi enteramente en la demostración de la presencia de T. foetus en el feto abortado (33).

2.5.11 Diagnóstico de laboratorio del aborto inducido por hongos (36).

La placentitis micótica es una de las más comunes causas de infecciones de aborto bovino; ocurre mucho menos frecuentemente en cerdas, peques y ovejas. Numerosas especies de hongos y levaduras han sido asociadas con abortos bovinos pero, Aspergillus spp., Alsidia spp., Rhizopus spp., Monilia spp. y Fusca spp. son las más comúnmente incriminados (36).

En el ganado bovino, los abortos micóticos son de naturaleza generalmente esporádica, más bien que epizooticos; sin embargo, en algunos casos la incidencia de abortos pueden alcanzar hasta un 10 % dentro de un hato. La enfermedad es de naturaleza algo estacional, y alcanza su pico de incidencia en el Hemisferio Norte en Enero, Febrero y Marzo (36).

Los abortos micóticos ocurren de los cinco meses de gestación en adelante, y el feto es usualmente expulsado poco después de que muere. Ocasionalmente este está vivo al nacimiento, pero usualmente muere poco después. Por esta razón los tejidos fetales a menudo están frescos y los pulmones parcialmente expandidos --- (36).

Las lesiones primarias del aborto micótico ocurren en la placenta, y las posibilidades de diagnosticar la enfermedad cuando el tejido placentario no está disponible para ser examinado se reducen grandemente. Por lo que debe enfatizarse a los veterinarios la importancia de suministrar la placenta de vacas abortadas al laboratorio de diagnóstico.

El examen macroscópico de la placenta infectada con hongos revela lesiones características. Parte o todo el cotiledón placentario frecuentemente está adherido a la cáncula materna dando una apariencia de engrosada, especialmente alrededor de la circunferencia más externa, esta área del cotiledón puede ser volteada hacia el centro de la estructura produciendo una apariencia de la

za. Ocasionalmente la mayoría de los coriáculos maternos se rompen al final del pedículo y son expulsadas pegadas a los cotiledones. Esto aparentemente ocurre más comúnmente cuando están invadidos hongos no septados, que cuando la infección es producida por el *Agaricillus* (36).

Las áreas intercotiledonarias de la placenta están engrosadas y correasas y la cantidad de necrosis placentaria observable macroscópicamente varía desde severa hasta prácticamente ninguna. La mayoría de las placentas infectadas son de color café, con una apariencia necrótica característica. Ocasionalmente los cotiledones son rojo oscuro, mientras que las áreas intercotiledonarias engrosadas están opacas y blancas (36).

Aunque las lesiones macroscópicas de la placenta son bastante distintivas en los casos de placentitis micótica, y los veterinarios experimentados pueden a ser un diagnóstico tentativo de esta enfermedad encontrando lesiones típicas, es bueno hacer notar que ciertas infecciones bacterianas de la placenta, tales como, Brucelosis y vibriosis producen lesiones, las cuales son bastante similares (36).

En aproximadamente el 25 % de los casos de placentitis micótica, los hongos invaden al feto, y lesiones circunscritas de la piel de menos de un cm. hasta 10 cm. de diámetro ocurren, siendo esto más frecuente en el cuello y la cabeza del feto.

La piel afectada por las lesiones se encuentra engrosada arrugada y seca. En el examen macroscópico, las áreas afectadas se parecen lesiones de tifo. La presencia bien definida de lesiones micóticas en piel, proporciona amplia evidencia para el diagnóstico de aborto micótico. Aunada a las lesiones en piel, la inflamación y congestión de los ganglios linfáticos periféricos, son la única otra lesión macroscópica frecuentemente vista en el feto bovino abortado por causa de una infección micótica. Otra característica común de las víctimas de la placentitis micótica son la emaciación y la deshidratación del feto. La piel aparece ligeramente arrugada como si el cuerpo se hubiera encogido dentro de la piel, dejando esta demasiado amplia (36).

La emaciación y la deshidratación del feto puede ser atribuida a la interferencia con su nutrición debido a la severa pla-

centitis. Sin embargo, otras condiciones (escasez de los vasos -- sanguíneos en las vellosidades), las cuales interfiere con el intercambio nutricional de la hembra y el feto pueden producir resultados similares (36).

La lesión microscópica más sobresaliente de la placentitis micótica ocurre en los tejidos que están alrededor de la periferia de los cotiledones. Grandes congregaciones de células polimorfonucleares se localizan dentro y debajo de las vellosidades del -- corión y cantidades variables de tejido necrótico rellenan los espacios entre las vellosidades, este desecho es el tejido materno -- y exudado, los cuales se han adherido a la placenta fetal. En este material necrótico se encuentran presentes en un alto número -- las hifas, acompañadas por una necrosis, vasculitis y trombosis -- (36). La hiperqueratosis e inflamación son aparentes en las lesiones de la piel. Las hifas son vistas más frecuentemente en la superficie de la epidermis y en los folículos pilosos, siendo visibles más fácilmente con una de las tinciones especiales para hongos.

Un firme diagnóstico de la placentitis micótica puede ser -- hecho por alguno de los siguientes hallazgos:

- 1) Encontrándose lesiones macroscópicas, microscópicas o ambas características de placentitis, y demostrado elementos micóticos asociados con estas lesiones (36).
- 2) Encontrando lesiones características de dermatomicosis en el -- feto, y demostrando por examen microscópico de estas lesiones, -- elementos micóticos asociados con signos de inflamación (36).
- 3) Encontrando bronconeumonía fetal asociada con elementos micóticos (36).

Hay indicaciones de que hongos y levaduras de fuentes desconocidas pueden estar presentes en el contenido amniotico de fetos -- abortados, cuando de hecho ellos no fueron la causa del aborto. -- Por esta razón, el hallazgo de hongos en el contenido amniotico es la sujeto a una interpretación cuidadosa cuando los elementos micóticos no son demostrables histológicamente en los tejidos fetal o placentario. El aislamiento de hongos del contenido amniotico, -- tejidos fetales y placenta es útil en la identificación de especies involucradas cuando se ha realizado un diagnóstico histológico

co de un aborto micótico (36).

A) Método de laboratorio.

A.1) Método histológico.

Los elementos micóticos pueden ser visibles por examen microscópico de secciones de tejidos frescos, congeladas o fijados en formol, teñidos con procedimiento estándar de hematoxilina eosina (H.E). La observación de los micelios se hace más fácilmente por tinción de secciones de tejidos con una de las tinciones especiales para hongos. *Aspergillus* spp. es especialmente difícil de detectar con tinciones de H.E. La técnica de Metanamina-nitrato de Plata de Gomori (22), la de Gridley (21), y la de ácido periódico de Schiff (38), han sido probadas satisfactoriamente (Apéndices 14, 15 y 16). Cuando las lesiones macroscópicas de la placenta son sugestivas de una infección micótica, el examen microscópico-directo del tejido aclarado con KOH ofrece una confirmación rápida del diagnóstico (Apéndice 17).

A.2) Cultivo de hongos.

La utilidad de los hongos tiene que ser considerada siempre, al coleccionar los especímenes y al interpretar los resultados de los procedimientos de cultivo. La piel y la placenta fetal están especialmente sujetas a contaminación. Los procedimientos para el cultivo de hongos están en el Apéndice 18.

Rhizopus spp., Mucor spp., Ascidia spp. y otros hongos de la clase Phicomycetes aparentemente no permanecen viables en los tejidos o contenido amniótico, por tanto tiempo como lo hacen los hongos de otros géneros. Frecuentemente cuando esos Phicomycetes están involucrados, los micelios pueden ser demostrados en los tejidos por métodos histológicos, pero no se pueden cultivar los micorganismos.

3. O B J E T I V O

Determinar los agentes etiológicos involucrados en un brote de abortos en levinos Holstein de Oaxaca, Oax.

4. MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Virología del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SARN, y en un establo con bovinos productores de leche, localizado en la ciudad de Oaxaca, en el cual se presentó un brote de abortos con la siguiente historia clínica:

El hato estaba formado por 320 animales de los cuales se encontraban en producción 250 en promedio, encontrándose los otros animales en desarrollo (vaquillas), para el reemplazo de los animales que se desechaban. En este establo se vacunaba contra brucelosis a los cuatro y seis meses de edad, contra IBR y PI-3 en forma anual en el mes de mayo o junio.

Se presentó desde el año de 1982 una cantidad anual de abortos que salía de la normalidad, se presentaron también diarreas repentinas, poco frecuentes, caracterizadas por ser sanguinolentas y pestilentes, las vacas afectadas fueron tratadas con oxitetraclinas, a la que ocasionalmente respondieron, aunque algunos murieron pocos días.

En los meses de junio, julio y agosto de 1983, el 75 % de las vacas presentó opacidad de cámara con exudado nasal, esto se presentó después de vacunar contra IBR, dicha vacunación se realizó en el mes de mayo con una vacuna vencida, por lo cual se revacunó en el mes de junio con una vacuna vigente.

Registros.- Se analizaron las tarjetas de registro de las vacas que se encontraban en el establo durante los años de 1983 y 1984.

Cultivos bacterianos.- De los animales con problemas reproductivos más recientes (22 animales), se colectaron mediante espécimen los esterilizados, muestras de exudado cérvico vaginal para inocultarlos en medios de cultivo. Para realizar bacteriología general (10 muestras), de acuerdo a lo descrito en los Apéndices 7 y 8, se intentó el aislamiento de Campylobacter fetus (en 18 muestras) mediante la inoculación de exudados en medio SET (Apéndice 19); y se intentó también el aislamiento de Tritrichomonas foetus mediante el procedimiento descrito en el Apéndice 13, con 10 muestras.

Pruebas serológicas.- A cada uno de los animales del esta-

Ello se les tomó, mediante una punción yugular, una muestra de sangre para la obtención del suero sanguíneo, para la realización de la prueba de aglutinación en placa, para el diagnóstico de *Brucella abortus* (Apéndice 11); a los animales positivos a dicha prueba se les realizó la prueba de fijación de complemento, para determinar si la respuesta en la prueba de placa se debió a una reacción de la vacuna o a una reacción de campo (47). A los 27 días del primer sangrado se tomó una muestra a los animales considerados como problema (70), con la finalidad de determinar anticuerpos en los títulos de anticuerpos mediante distintas pruebas serológicas.

Se realizó la prueba de aglutinación microscópica utilizando los serotipos de *Leptospira* enlistados en el Cuadro 4. La descripción de la elaboración de dicha prueba se presenta en el Apéndice 2.

Se realizaron las pruebas de seroneutralización para el diagnóstico de IBR y BVD, de acuerdo a lo descrito en los Apéndices 20 y 21.

Se realizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación para el diagnóstico de PI-3 de acuerdo al Apéndice 22.

Pruebas de anticuerpos fluorescentes.- Con una muestra de hígado y pulmón de fetos abortados recientemente, las cuales fueron conservadas a -70°C , se realizó la técnica de anticuerpos fluorescentes para el diagnóstico de IBR (Apéndice 7), y utilizando la misma técnica, pero sustituyendo el conjugado por uno de cólera porcino (virus heterotípico), se intentó el diagnóstico de BVD.

Vacunación.- Debido a que la literatura comunica que una cantidad importante de los animales que son inoculados con el virus de BVD son seronegativos, es decir no presentan respuesta inmunológica (69), y ya que clínicamente el brote era similar a BVD, se realizó una vacunación con virus heterólogo (vacuna PAV-250 contra el cólera porcino) a media dosis inicialmente y posteriormente con dosis completa en los meses de mayo y septiembre de 1984. En la literatura se han notificado resultados satisfactorios al intentar prevenir la BVD utilizando la vacunación con vacuna -

contra el cólera porcino (11).

Aflatoxinas.— Se intentó detectar la presencia de aflatoxinas en diversos componentes del alimento concentrado (maíz, salvado, granillo, sorgo y semola), la técnica seguida fue de cromatografía en capa fina y la lectura frente al estándar de B_1 , Zeaxalenone y 7_2 con luz U. V. (55).

La lectura y la interpretación de los resultados en el caso de los cultivos bacterianos fue por microscopía de la morfología colonial y la pigmentación, considerándose como positivos el aislamiento de algún tipo específico de bacterias y como negativo el no crecimiento de las mismas (1, 8).

La interpretación de los resultados para las pruebas serológicas se hizo de acuerdo a lo sugerido por Kahane (19), y por Kirkbride (35). Los cuales establecen para el diagnóstico de BVD, un aumento de dos a cuatro diluciones en el título de anticuerpos entre el primer suero y el segundo, sugiere que el animal padeció la enfermedad en este momento; y para el diagnóstico de IBR se requiere de un aumento de cuatro diluciones dobles.

Se realizó una prueba de T para serie de datos de acuerdo con Snedecor (58), para realizar una interpretación de resultados en base a grupos, donde dichos grupos están formados por los animales que tuvieron un aumento en su título de anticuerpos (Grupo 1), animales que mantuvieron estable su título de anticuerpos (Grupo 2); y animales que tuvieron una disminución en su título de anticuerpos (Grupo 3). Las enfermedades analizadas de esta forma fueron IBR, BVD y PI-3.

La interpretación de la prueba de anticuerpos fluorescentes se intentó con base en la detección de la presencia de focos fluorescentes en el campo del microscopio.

La evaluación del efecto de la vacuna contra el cólera porcino, aplicada a los levinos para la prevención de BVD, se hizo directamente en el establo con base en el comportamiento del lote, evaluando el aumento o la disminución del número de abortos, con respecto a los meses inmediatos anteriores a la aplicación de dicha vacuna.

La interpretación de las pruebas para el diagnóstico de Bruceella abortus fue en base a la observación directa de aglutinación

considerandose positivas si existía aglutinación, o negativas si la mezcla permanecía sin aglutinación. En el caso de los animales positivos, se analizaron los datos de su tarjeta de registro, en la cual se buscaban la presencia de otros o problemas reproductivos. Para la prueba de fijación de complemento se consideraba que un animal había padecido la enfermedad si presentaba títulos iguales o mayores a 1:40.

5. RESULTADOS

El brote de abortos empezó en el año de 1982 ya que el porcentaje de abortos para ese año, puede considerarse como ligeramente anormal (6 %). En el año de 1983 hubo 40 abortos (16 %). Esos ocurrieron desde los dos hasta los ocho meses de gestación, - con mayor frecuencia a los cuatro meses de gestación (Cuadro 5). - En el año de 1984 hubo 33 abortos (13,2 %); dichos abortos ocurrieron desde los cuatro hasta los ocho meses de gestación, presentándose con la frecuencia descrita en el Cuadro 5. Los porcentajes de abortos durante estos dos años y el efecto aparente de la vacunación con la vacuna contra el cólera porcino (PAV-250), con miras a prevenir diarrea viral bovina, se muestran en la Gráfica 1.

ESTUDIOS BACTERIOLÓGICOS:

Respecto a la inoculación de los diez exudados cérvico vaginales en medios bacteriológicos generales, así como la inoculación de diez muestras para intentar aislar en medios específicos y de diez para el aislamiento de Campylobacter fetus y Tritrichomonas foetus, únicamente hubo crecimiento en las cuatro muestras siguientes:

VACA No.	AGENTE AISLADO
236	<u>Corynebacterium</u> spp.
70PB	<u>Aerococcus</u> spp. y <u>Staphylococcus</u> spp.
169	<u>Aerococcus</u> spp. y <u>Staphylococcus</u> spp.
*75	<u>Campylobacter</u> spp.

*Esta vaca se muestró dos veces y en el segundo resultó negativa.

SEROLOGIA DE BRUCELOSIS:

La prueba de tarjeta para el diagnóstico de Brucella abortus detectó 42 positivos (pero solo uno de ellos tenía historia clínica de aborto), y 277 negativos. Al hacer pruebas de fijación del complemento con los sueros positivos a la prueba de tarjeta, se encontró que todos resultaron negativos.

DIAGNOSTICO DE IBR, BVD y PI-3:

Los resultados de las pruebas de seroneutralización para el diagnóstico de IBR y BVD, y los resultados de la prueba de la inhibición de la hemoaglutinación para el diagnóstico de PI-3 se presentan en el Cuadro 6.

Los resultados de la prueba de T para análisis de grupos -- muestran lo siguiente en el Cuadro 7.

Los efectos de la vacunación contra el virus de BVD mediante la utilización de un virus heterotípico (CP-PAV-250), a medias dosis y con dosis completa, se presentan en la Gráfica 1.

Los resultados de las pruebas de anticuerpos fluorescentes para el diagnóstico de IBR y BVD, fueron negativos en todos los casos. Los resultados de la prueba de aglutinación microscópica -- contra diversos tipos de leptospiras, mostró solo en una vaca un incremento del título de anticuerpos de negativo a 1:50 contra -- Leptospira icterohaemorrhagiae y en otra vaca una disminución del título de anticuerpos de 1:100 a negativo contra Leptospira pomona.

Los resultados de la prueba de cromatografía en capa fina y lectura frente al estándar de Aflatoxina B₁, Zearalenone, y Aflatoxina T₂ con luz U. V., revelaron la presencia de 0.4 ppb. de -- Aflatoxina B₁ en el sorgo. Todas las demás muestras resultaron negativas (Cuadro 8).

6. DISCUSIÓN

La Gráfica No. 1 muestra que la mayor incidencia de los abortos ocurrieron en los meses de junio y agosto de 1983, y junio de 1984. La mayor frecuencia de los periodos de gestación en que ocurren los abortos fue entre los cuatro y los seis meses (Cuadro 5), y en segundo término de los tres a los ocho meses.

El aislamiento en este trabajo, de bacterias en el 10,5 % de las muestras, mediante la inoculación en los medios de cultivo bacteriológico, mostraron que varias de las bacterias aisladas -- (Streptococcus spp., Cornebacterium spp., Campylobacter spp.) -- pueden ser agentes etiológicos en la producción de abortos (1). Sin embargo, Messier et al, (63), al realizar un estudio comparando la toma de muestra intrauterina con torunda contra la toma de muestra mediante biopsia intrauterina, encontraron que a partir de animales clínicamente normales se pueden aislar Streptococcus spp., S. faecalis, Staphylococcus spp., Neisseria spp. Esta última bacteria también fue aislada en esta tesis.

Por otro lado, Jernst et al (27), al realizar un diagnóstico de 265 abortos en el 35 % de los casos, aisló: Hongos, Salmone-lla spp., Campylobacter fetus, Cornebacterium pseudom, Leptospira interrogans serovar hardjo, Leptospira interrogans serovar pomona, Listeria monocytogenes, Bruceella abortus, otras bacterias, protozoarios, IBR y Chlamydia spp.

Myrrea (47), evaluó diferentes pruebas para el diagnóstico de brucelosis, tales como: el aislamiento bacteriológico, prueba de aglutinación en tarjeta con rosa de bengala, prueba de cristal violeta, prueba de anillo de leche y prueba-aglutinación. Siendo las de resultados más satisfactorios: la prueba de fijación de -- complemento, combinada con la prueba de anillo de leche y la prueba de tarjeta. Las cuales pueden ser usadas en forma satisfactoria para el diagnóstico de brucelosis (47). Una de las desventajas -- que presentó la prueba de fijación de complemento fue su complejidad para realizarse y el tiempo de elaboración que requirió; por otro lado, estos factores son una ventaja a favor de la prueba de tarjeta. Una de las ventajas que mostró la prueba de tarjeta en -- dicho estudio, fue el presentar un bajo nivel de falsos negativos al compararse con la fijación de complemento y con las pruebas

de aislamiento. Aunque por otra parte dió un alto nivel de falsos positivos. Esto se atribuye a la posible reacción en la prueba de rosa de bengala con otro tipo de anticuerpos diferentes a los --- F C' (47).

En el presente trabajo hubo un solo animal con historia clínica de abortos (3 %), y con resultado de aglutinación en placa positiva a brucelosis. Lo cual no fue significativo de que el hato padeció brucelosis. Este resultado positivo podría atribuirse a la forma de interpretación de la prueba, o quizá a un efecto residual de anticuerpos vacunales (47). Correa (17), realizó un estudio para determinar la presencia de anticuerpos, contra: IBR, BVD, PI-3, Brucelosis, Leptospirosis, Vibriosis, Haemophilus --- somnus, en hatos con problemas respiratorios y de abortos. En dicho estudio no hubo Leptospirosis en este último caso, el criterio de evaluación fue que los títulos menores de 1:16 sean negativos. Se considera que la presencia de títulos de anticuerpos de 1:16 u mayores indican que el animal ha experimentado la infección por Leptospira (54). Jernst et al (127), al realizar un diagnóstico de 265 abortos bovinos, encontraron que los tres animales que padecieron Leptospira interrogans serovar pomona tenían títulos mayores de 1:1024 al momento del aborto; en cinco casos se diagnóstico L. interrogans serovar hardjo; en 4 de ellos hubo títulos similares a los anteriores y en el otro hubo seroconversión desde títulos negativos hasta 1:1024. Los establos en que ocurrió dicha enfermedad no había sido vacunados contra Leptospira.

En el estudio cubierto por esta tesis la presencia de dos animales (6.46 %), con títulos no significativos, sugieren que la Leptospirosis no fue la causa de los abortos; sin embargo es importante continuar el seguimiento de este hato, para comprobar -- que no se trate de la fase inicial de un futuro brote ocasionado por Leptospira.

La presencia de IBR, BVD y PI-3 ha sido bien reconocido en algunas partes del país (15). En 1978 se comunicó un trabajo hecho con sueros de bovinos procedentes de establos con problemas respiratorios y abortivos, encontrándose un 64.4 % de hembras con anticuerpos contra IBR, no pudiendo identificar si estos eran de tipo vacunal o resultado, de la infección de un virus de campo. --- Brown (7), señala que los hatos no expuestos a IBR; no previamente

te vacunados, que son expuestos a portadores naturales, o son vacunados con la vacuna intramuscular contra IBR, pueden desencadenar "tormentas" de abortos. Schultz y Schellfy (57), mencionan que el virus IBR de los bovinos produce una infección primaria, de tipo respiratorio o genital y que permanece infectado en forma latente al animal, aparentemente de por vida, pudiéndose reactivar la infección por el parto o por la administración de corticosteroides a dosis de ≥ 10 mg por tres o más días. Kahana and Thorsen -- (29), establecen que en el muestreo serológico doble, la primera y la segunda muestras de suero, se deben titular simultáneamente, y que si se observa un incremento de cuatro diluciones dobles, se podría dar como positivo a IBR el caso. Sin embargo, el valor diagnóstico de un solo suero colectado en el momento del aborto es mínimo, debido a que son muchas las causas del aborto en los bovinos ya que los anticuerpos séricos contra muchos virus endémicos son comunes (28), y el aborto o el nacimiento de fetos con anomalías congénitas pueden ocurrir meses después de que se inicia la infección. A menos, que el aborto ocurra temprano en la infección, los cambios asociados a los aumentos en los títulos de anticuerpos habrán finalizado antes de que se colecte la segunda muestra (29).

En el presente trabajo, se observó que en dos ocasiones la máxima frecuencia de abortos ocurrió en el mes siguiente de la vacunación contra IBR. Lo cual podría sugerir que la vacuna no funcionó (por mal manejo), y que esto pudo propiciar que el aborto siguiera ascendiendo (Gráfica 7).

Por otro lado en los resultados de las pruebas de seroneutralización del Cuadro No. 6, se observa que en el caso de IBR se manejan tres grupos: en la parte superior están los números de los animales que tuvieron un incremento en su título de anticuerpos; en medio están los animales que no tuvieron un incremento y al final están los que tuvieron una disminución en su título de anticuerpos contra IBR. Entre los animales que abortaron y que tuvieron un incremento en su título de anticuerpos se encontraron 3 -- (Nos. 247, 236 y 271), que tenían un aumento de cuatro o más diluciones dobles (18.75 %); otros tres (18.75 %), tenían un incremento de tres diluciones dobles (Nos. 1867, 7 y 219) seis (37.5 %)-

un incremento de dos diluciones; y los cinco restantes tuvieron un aumento de una sola dilución doble. Estos aumentos en los títulos de anticuerpos contra IBR muy probablemente no se debieron a las vacunaciones contra IBR, ya que estas vacunaciones se aplicaron tres meses antes del muestreo serológico (Cuadro 6 y Gráfica 1). Es importante señalar, que el 25 % del total de los animales que abortaron mostraron incrementos en sus títulos de anticuerpos contra IBR; por lo que se pudo inferir que IBR estuvo involucrado en la producción de abortos en este hato, de acuerdo Karha y Thomsen (29). IBR solo estuvo comprometido en el 7,5 % de los casos de abortos, ya que estos son los únicos que mostraron un incremento significativo en los títulos de anticuerpos de la segunda muestra de suero.

Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) al realizar la prueba de "T" (58) para el grupo que tenía un incremento en sus títulos de anticuerpos, lo cual sugiere que IBR puede estar produciendo hasta un 15,5 % de los abortos.

La presencia en el país de BVD, ha sido estudiada encontrándose aparentemente bastante difundida (13). En este estudio se encontraron 16 animales positivos a BVD (25 %); de los cuales solo cuatro (6,25 %) mostraron un ligero aumento en sus títulos de anticuerpos. Esto debe evaluarse cuidadosamente, ya que los resultados de las pruebas de seroneutralización realizadas señalan que no hubo incremento significativos en los títulos de anticuerpos en la segunda muestra.

Con base en estos resultados se podría pensar que BVD podía no estar involucrada en este brote.

Bittle y Crandell mencionan que aunque se pueden utilizar pruebas de detección de anticuerpos, se debe recordar que algunos animales no producen anticuerpos contra BVD, y que por esta razón una prueba negativa a anticuerpos, no excluye la posibilidad de que dicha enfermedad esté presente (5). En esta tesis hubo 4 animales (6,25 %) con anticuerpos contra BVD y que nunca presentaron abortos. La presencia de un número de animales positivos a anticuerpos contra BVD, que nunca mostraron la enfermedad, indicaría que el virus que los infectó pudo ser inmunogénico y apatogénico para ellos. Por otro lado la presencia de resaca dentro del primer tercio de la gestación pueda corresponder a BVD (Gráfica -

2). lo cual aumenta la posibilidad de que se trate de BVD. Sin embargo, al analizar mediante la prueba de "T" los resultados de este trabajo, no se encontró diferencia significativa ($p < .05$) con respecto a BVD.

La respuesta a la vacunación contra BVD es objeto de diversas controversias en E.U.A. (25), ya que algunos animales fallan al producir anticuerpos después de la vacunación. En el presente trabajo, la aplicación de una vacuna con virus heterolópico, o sea el virus de la vacuna PAV-250 contra el cólera porcino, de acuerdo con la Gráfica 1, coincidió con la baja inmediata del número de abortos. Lo cual muestra que pudo haber una participación de BVD en el brote. Y que la vacuna PAV-250 pudo haber disminuido el brote.

Sin embargo aunque no pudo ser corroborado mediante la cuantificación de los títulos de anticuerpos contra BVD y contra cólera porcino, que el 19 % de animales previamente mencionados, con anticuerpos contra BVD y con historia de abortos pudieron haber abortado a consecuencia de la infección por BVD. En la literatura consultada (13) se menciona que la vacunación con vacuna de cólera porcino es efectiva para controlar brotes de BVD; sin embargo en México no existen comunicaciones de datos experimentales al respecto, además de la observación hecha en este trabajo.

Los resultados de la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI) muestran que una vaca (1.58 %) tuvo un incremento de dos diluciones dobles en su título de anticuerpos en la segunda muestra 7 (11 %) un aumento de una sola dilución; mientras que 4) (68.2 %) permanecieron sin cambios; y 13 (20.6 %) presentaron una disminución en su título de anticuerpos. De los animales que presentaron un aumento en su título de anticuerpos contra PI-3, la vaca que tuvo un aumento de dos diluciones, y cinco más con aumento de una dilución presentaron historia de abortos (Cuadro 6). Al realizar la prueba de "T" se encontró diferencia significativa entre el título de anticuerpos del primer sangrado y el título de anticuerpos del segundo sangrado; en los animales que tuvieron incremento en el segundo sangrado. Esto podría sugerir que el 9.5 % de los animales abortados pudieron estar afectados por el virus de PI-3. La literatura consultada (17) señala que es posible pro-

ducía aborto y alteraciones fetales, al inocular experimentalmente vacas gestantes con virus de PI-3. Sin embargo, no se sabe de casos de campo en que se comprueba que PI-3 pueda producir aborto en condiciones naturales.

En 21 vacas (33 %) hubo evidencias serológicas de infección por un solo agente etiológico de abortos que en 2 vacas (3.1 %) - hubo evidencias de infección por 2 agentes; y en una vaca (1.6 %) hubo evidencias serológicas de infección múltiple por IBR, BVD y PI-3 (Cuadro 6).

7. CONCLUSIONES

- A) Los agentes bacterianos estuvieron involucrados en el 14,3 % de los casos estudiados.
- B) Leptospirosis y Brucelosis no estuvieron involucrados.
- C) El virus de IBR estuvo involucrado entre un 7,7 % y un 15,15 % de los casos estudiados.
- D) El virus de BVD pudo estar comprometido en un 19 %.
- E) El virus PI-3 pudo estar involucrado en un 4,3 %.
- F) La vacunación con virus heterotípico PAV-250 contra cólera porcino, coincidió con la baja del número de abortos.
- G) Es importante enfatizar que las vacunas deben ser manejadas en condiciones correctas de refrigeración.
- H) Es urgente establecer en el país pruebas de laboratorio para el diagnóstico de abortos, de realización rápida y de resultados confiables.
- I) En tres (4,7 %) de las vacas estudiadas hubo evidencia de infección simultánea por dos o tres agentes productores de abortos.

APENDICE No. 1

TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES PARA DIAGNOSTICAR EL VIRUS- IBR (52).

Se pone en el portamuestras del criostato una pequeña cantidad de medio para montar muestras de tejido congelado, y se incluye en este un cubo de tejido de aproximadamente uno a uno y medio cm. del lado. El tejido es congelado por inmersión en acetona a -70°C , poniendo en un congelador a -70°C o pueda ser usado un aparato congelador de tejidos con CO_2 líquido.

Se corta una sección del tejido a aproximadamente 8 micras de grueso, se monta en un portaobjetos, y este se pone en un vaso de Coplin conteniendo acetona a -20°C . La placa puede ser tenida inmediatamente, o almacenada en acetona fría hasta que sea conveniente.

Se dispersa globulina de ternera anti IBR marcadas con isotiocianato de fluoresceína sobre una porción del tejido y se le permite reaccionar 20 minutos en una cámara húmeda a 37°C . Entonces se enjuaga la laminilla dos veces en Solución de fosfatos bufferada (PBS), 0.1 M, a pH de 7.2, y una vez en agua destilada. Se aplica a la sección tenida una pequeña cantidad de líquido para montaje, consistente en volúmenes iguales de glicerina y PBS, y posteriormente se le pone encima un cubicoobjetos.

Para las secciones de tejido placentario se aplica por dos minutos la tinción de contraste (Albúmina marcada con Rodamina) sobre la sección de tejido, antes de que este es tenido con el conjugado. O pueda ser mezclado con el conjugado en una dilución propia para permitir ténia de contraste en un solo procedimiento. El exceso de tinción de contraste es removido mediante un enjuague en PBS y agua destilada similar al del conjugado.

Se examina con microscopio de campo oscuro la sección de tejido tenido, usando una fuente de luz de vapor mercurial. Se puede usar una combinación compatible de filtros excitadores y de barrera; han sido encontrados convenientes un filtro excitador BG 12 y un filtro de barrera K-330.

La fluorescencia específica de IBR ocurre en focos de células fluorescentes. En tejidos renales, la fluorescencia es apa-

nente solo en el citoplasma de las células intersticiales; en hígado, bazo y pulmón los focos fluorescentes están dispersos a través del parénquima.

La especificidad de la fluorescencia puede ser asegurada -- preparando un duplicado con las secciones de los tejidos, tiñendo estas con un conjugado normal preparado con globulinas bovinas. -- El procedimiento de tinción es el mismo ya descrito. La fluorescencia focal específica de IRR tiene que ser vista solamente en las secciones teñidas con el conjugado preparado con globulinas anti-IRR. En las secciones teñidas con el conjugado preparado con las globulinas normales habrá células autofluorescentes dispersas y fluorescencia de fondo.

Para chequear todavía más la especificidad de la fluorescencia, se puede aplicar antisuero específico contra IRR sobre la superficie de otro conteniendo secciones del tejido problema, e incubar durante 10 minutos en una cámara húmeda a 37°C. La laminilla es enjuagada tal como se describe en el procedimiento regular para la técnica F.A. A partir de este punto la laminilla será teñida con anticuerpos fluorescentes contra IRR usando el procedimiento descrito. La fluorescencia específica debe ser fuertemente inhibida o completamente bloqueada cuando se la compara con la fluorescencia presente en el tejido no neutralizado.

APENDICE No. 2

PRUEBA DE AGLUTINACION MICROSCOPICA (MA) PARA EL DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSIS (54). (PRUEBA DE AGLUTINACION-LISIS)

Con la técnica de MA, diluciones seriadas de suero son mantenidas en contacto por cierto periodo con un volumen igual de una suspensión de leptospiras. Cuando la prueba es realizada con organismos vivos, los fenómenos de aglutinación y lisis ocurren simultáneamente. Únicamente ocurre aglutinación cuando se usan como antígeno leptospiras muertas con formalina ya que los organismos se han vuelto resistentes a la acción de las lisinas. La lisis difiere de la bacteriolisis, en que ésta ocurre sin la presencia del complemento.

PROCEDIMIENTO.

- 1) Se ponen 0.9 ml. de sol. salina fisiológico o sol. bufferada - de Sorensen (Apéndice 4), en cada uno de 4 tubos de prueba. Al primer tubo se le adicionan 0.1 ml. de una dilución 1/5 del suero desconocido y se mezclan. Se hacen diluciones seriadas - decuples, transfiriendo 0.1 ml. de esta dilución al tubo No. 2 y se mezcla. Después se transfiere 0.1 ml. de esta dilución al tubo No. 3, etc. (Ver Tabla 1). Se hace lo mismo para cada suero desconocido.

TABLA No. 1
DILUCION DE LOS SUEROS
(TODOS LOS VALORES ESTAN EN ML.)

Tubo	1	2	3	4
Sol. Sal. F.	0.9	0.9	0.9	0.9
Suero	0.1	0.1	0.1	0.1
Dilución Resultante	1/50	1/500	1/5000	1/50000

- 2) Al mismo tiempo que se están haciendo las diluciones seriadas - decuples, se transfiere 0.1 ml. de cada dilución a un tubo de aglutinación prontamente identificado.

- 3) Para cada tubo de aglutinación conteniendo 0.1 ml. de suero -- diluido, se adiciona un volumen igual de antígeno, el cual consiste en un cultivo motil de *Leptospiras* de 5 a 7 días de edad crecidas en medio de Stuart enriquecido con un 7 a 10% de -- suero de conejo, o medio de polysorbato albúmina bovina. Esto dara diluciones finales de 1/100, 1/1000, 1/10 000 y 1/100 000. Los sueros positivos, los negativos, y los controles salinos -- deberán ser incluidos en cada prueba corrida.
- 4) Se deja que la mezcla antígeno-suero se incube a 37°C por aproximadamente dos horas.
- 5) Se examinan los tubos individualmente, observando pequeñas gotas de mezcla antígeno-suero por iluminación en campo oscuro con un aumento de alrededor de 120 a 150 X.

Un suero es juzgado como negativo cuando las *Leptospiras* -- permanecen con movimientos libres individualmente, dispersas uniformemente a través del campo en todas las diluciones, de forma similar al antígeno control. Los sueros son designados como positivos cuando ha ocurrido aglutinación, lisis o omías en la mitad o más de las *Leptospiras*, en una o más de las diluciones séricas. Los títulos finales son determinados por la presentación de la -- reacción en la dilución sérica más alta.

También puede ser encontradas algunas *Leptospiras* con movimientos libres. La aglutinación es detectada por la presentación de grandes o pequeñas masas de *Leptospiras* enredadas, en las -- cuáles, los movimientos parciales de los extremos libres de las *Leptospiras* pueden ser perceptibles.

En las más altas diluciones de los sueros fuertemente positivos, se observa enseguida de las estructuras de aglutinación -- los signos de lisis, y ocurre la desintegración de las *Leptospiras* que están enredadas en las masas aglutinadas. La red se transforma gradualmente en un grupo de masas blancas con brillantes contornos redondeados. Saliedo de su periferia se pueden observar -- cuerpos leptospiridicos moviendose lentamente. En algunos casos -- pueden estar completamente lisadas, por lo que el campo esta practicamente vacío, con la excepción de unas cuantas manchas blancas y unas cuantas *Leptospiras* moviendose alrededor.

NOTA: En general, las primeras trazas de aglutinación y lisis no ocurren en la misma dilución; usualmente la aglutinación se esta-

- Hece primero, y es substituida por la lisis a un titulo más alto. Si un suero es fuertemente positivo las *Leptospiras* pueden ser -- encontradas aglutinadas en las más bajas diluciones hínicas.

APENDICE No. 3
MEDIO DE FLETCHER* (18).

Solución	Cantidad
Peptona	0.3 gr.
Extracto de carne	0.2 gr.
NaCl	0.5 gr.
Agar	1.5 gr.
Suero de conejo	80 ml.
Agua destilada	920 ml.

- 1) Mezclar todos los ingredientes, excepto el suero de conejo en agua destilada.
- 2) Calentar a ebullición, o hasta obtener una solución.
- 3) Esterilizar por 15 minutos a 15 libras de presión.
- 4) Enfriar el medio y adicionar el suero de conejo ligeramente -- hemolizado estéril, e inactivado por calor durante media hora a 56°C.
- 5) Envasar asépticamente, e inactivar el medio completo durante una hora a 56°C.

* Laboratorios DIFCO.

APENDICE No. 4
MEDIO DE STUARTS* 164).

Solución	Cantidad
Asparagina	0.132 gr.
Na_2Cl	0.268 gr.
MgCl_2	0.406 gr.
NaCl	1.88 gr.
Glicerina	5.0 ml.
R rojo de Fenol	0.01 gr.
Sol. Bufferada de Sorensen	80.00 ml.
Agua destilada.	915.00 ml.

- 1) Todos los ingredientes sólidos son pesados y mezclados en un matraz con agua destilada.
- 2) Se adicionan y se mezclan la solución Buffer y la glicerina.
- 3) Se esteriliza el medio a 15 libras de presión por 15 minutos.
- 4) Enfriar y filtrar a través de tres capas de papel filtro.
- 5) Distribuir en matraces y tubos de tapon de rosca.
- 6) Se esteriliza a 15 libras por 15 minutos.
- 7) Se enfata y se le adiciona del 8 al 10 % de suero de conejo -- estéril, inactivado a 56°C durante una hora.
- 8) El ph final debe de ser de 7.2 a 7.4.

Solución Buffer de Sorensen

Na_2HPO_4	8.33	gr.
KH_2PO_4	1.09	gr.
Agua destilada	1	l.

El ph final debe de ser de 7.6

* Laboratorio DIFCO.

APENDICE No. 5
MEDIO DE POLYSORBATO Y ALBUMINA BOVINA (17).

Solución Buffer 25 X

A) Mezclar en este orden:

Agua destilada estéril	700	ml.
Na_2HPO_4	16.6	gr.
KH_2PO_4	2.172	gr.
Agua destilada estéril CDP	1 000	ml.

Salas base concentradas

(Solución concentrada 20X)

Agua destilada estéril	700	ml.
NaCl	38.5	gr.
NH_4Cl	5.35	gr.
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	3.81	gr.
Agua destilada estéril CDP	1 000	ml.

Solución de metales traza

Sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
30 mg. a 100 ml. de agua destilada
estéril.

Sulfato de Zinc $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
80 mg. a 200 ml. de agua destilada
estéril.

Solución de metales traza (Continúa).

Sulfato ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
500 mg. a 200 ml. de agua destilada
estéril.

Vitamina B-12 cristalizada
10 mg. a 100 ml. de agua destilada
estéril (SOLUCION MADRE)

Vitamina B-12 (Solución de trabajo)

Agua destilada estéril 90 ml.

Sol. madre concentrada 10 ml.

Tiamina HCL

200 mg. 100 ml. de agua destilada estéril,
 Polysorbato 80 (Tween 80)
 Solución al 10 %
 Polysorbato 80 10 ml.
 Agua destilada 70 ml.
 estéril

Se disuelve por volao en el agua calentada a 60°C y se ajusta el volumen a 100 ml.

Solución al 1 %

Se adicionan 900 ml. de agua destilada estéril a los 100 ml. de solución al 10 %. Para almacenar, se congelan -- frascos con 130 ml. de solución a -60°C.

SOLUCION DE ALBUMINA BOVINA

Para 40 ml. de solución buffer 25 X, se adicionan 960 ml. de agua destilada, separando 200 ml. por frasco y esterilizando 15 minutos a 15 libras de presión.

Se adicionan 5 gr. de polvo de albúmina sérica bovina por cada 100 ml. de solución, al 5 %.

Se filtra la solución de albúmina de bovino a través de un doble filtro (0.1), utilizando un filtro Zeita de 2 filtros de capacidad o un filtro millipore de 100 N.

Se incuba por 48 hrs. a 37°C y se hace un examen bacteriológico para checar esterilidad.

Medio completo hecho con las soluciones originales.

Sol Buffer 25 X	40 ml.
Sales base 20 X	50 ml.
Agua destilada estéril	700 ml.
Sulfato de Cobre	1 ml.
Sulfato de Zinc	10 ml.
Sulfato Ferroso	20 ml.

Agitar el precipitado 5 minutos.

L. Cistina 200 mg.

Agitar 5 minutos y filtrar a filtrar a través de 2-
 hojas de papel filtro No. 1.

Vitamina B-12	(Sol. de trabajo)	20	ml.
Solución de Tiulina		0.1	ml.
Solución Polysorbato 80 (1%)		120	ml.

Aforar a un litro de volumen con agua destilada estéril.
Para un medio semisólido, adicionar 2.5 gramos de Agar -
por litro (0.2 %).

Para un medio sólido, adicionar 12.5 gramos de Agar por-
litro (1%).

Envase y esterilice por 15 minutos a 15 libras de pre-
sión.

Adicione la solución de albúmina.

Después de esterilizar, el medio líquido es enfriado a -
temperatura ambiental, y se adiciona la cantidad correc-
ta de solución de albúmina estéril.

Los medios conteniendo 1 % de Agar son enfriados a 56°C-
en baño María, se les adiciona la cantidad correcta de -
solución de albúmina y se mezclan.

El medio sólido se distribuye en cajas de petri y se deja
endurecer.

Para 8 ml. de medio adicionar 2 ml. de sol. de albúmina.

Para 80 ml. de medio adicionar 20 ml. de sol. de albúmi-
na al 5 %.

Para 400 ml. de medio, adicionar 100 ml. de Sol. de albu-
mina al 5 %.

* Nutritional Biochemicals Corp.

APENDICE No. 6

ADICION DE 5 FLUOROURACIL PARA CONTROL DE CONTAMINANTES (54).

- 1) Disuelve 100 mg. de 5 fluorouracil* en 10 ml. de solución Buffer Na_2HPO_4 , 0.02 N. con pH de 7.4.
- 2) Esterilizan por filtración a través de un filtro Millipore -- con porosidad de 0.45 μ .
- 3) Adicionan 0.07 ml. a cada ml. de medio.
Concentración final 100 ng/ml. de medio.

ADICION DE NEOMICINA PARA CONTROL DE CONTAMINANTES (2).

- 1) Disuelve Sulfato de neomicina en Solución Buffer de Fosfatos.
- 2) Esterilizan por filtración (Similar a 5 fluorouracil).
- 3) Agregan solución base de sulfato de neomicina para producir una concentración final de 1 μ g/ml de medio de Fellecher o -- 300 μ g/ml. de medio de Ellinghausen.

* Laboratorio Cal. Biochem.

APENDICE No. 7

MEDIO TRIPTOSA AGAR CON SANGRE DE BOVINO (61).

Solución	Cantidad
Triptosa	20.0 gr.
Extracto de carne	23.0 gr.
NaCl	5.0 gr.
Glucosa	0.3 gr.
Dextrina	0.5 gr.
Agar	20.0 gr.
Agua	1 lt.

Se disuelve todo por calentamiento, se enfala y se ajusta al pH a 7.4 con NaOH 1N., se esteriliza a 121°C durante quince minutos en el autoclave, se enfala a 45°C y se adiciona 5 % de sangre desfibrada estéril de bovino.

El medio anterior soporta el crecimiento de las bacterias comunes recuperadas de los materiales abortados. Las cajas son -- incubadas rutinariamente en una atmósfera conteniendo el 10 % de CO₂.

APENDICE No. 8

AGAR SANGRE CON ANTIBIOTICOS (8).

Para la elaboración del agar sangre con antibióticos se utiliza un medio comercial de agar con infusión de cerebro y corazón. El cual se prepara de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta, se agregan 360 ml. del medio a un matraz de 500 ml. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos, se enfila a 50°C en baño de María y se le adicionan 40 ml. de sangre desfibrinada fresca de bovina. Se depositan 20 ml. de medio en cada caja de Petri- después de que el medio se ha solidificado, se permite que la superficie del agar se seque a temperatura ambiente toda la noche.- Se refrigeran las cajas en recipientes cerrados hasta su uso.

Dependiendo del tipo de antibiótico que se quiera usar a -- los 40 ml. de sangre se les agregan las siguientes cantidades de antibióticos.

Nicotinilín (Nistatin)	25 000 U.
Dacilnacina	2 000 U.
Albamicina (Novobiocina)	4 000 U.
Polimixina	500 U.

Mezclando cuidadosamente la sangre con los antibióticos antes de adicionarlos al medio.

APENDICE No. 9

MEDIO DE THIOLICOLATO* (8).

A) El medio líquido de thioglicolato, es un medio comercial, el cual se disuelve en agua, se depositan 10 ml. por tubo de cultivo con tapa metálica. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos y se almacena a temperatura ambiente hasta por una semana. Posteriormente se desecha este medio y se elabora nuevo medio.

B) Para la realización de pruebas metabólicas, se deberá usar una colonia aislada de vibrios, inoculada en medio líquido de thioglicolato, incubada durante tres días a 37°C y libre de contaminación.

1) PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SAL.

Preparar medio líquido de thioglicolato, tal como se describe en A, con la adición de 45 g/l de NaCl antes de envasar en tubos de ensayo, esterilizar el medio en autoclave.

Inocular un ml. de cultivo de vibrios (como se describe en el inciso B) dentro de tubos conteniendo medio de thioglicolato con 4 % de sal (NaCl).

2) PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLICINA.

Preparar medio líquido de thioglicolato tal como se describe en el inciso A, con la adición de glicina (10 gr. por litro) - antes de envasar en tubos y esterilizar el medio.

Inocular un ml. de cultivo de vibrios (como se describe en el inciso B) dentro de un tubo conteniendo medio de thioglicolato con uno por ciento de glicina. Examinar el crecimiento después de cinco días. C. fetus venerealis es inhibido por el 1% de glicina mientras que el C. fetus intestinalis crece bien en este medio.

3) PRUEBA DE TOLERANCIA AL CALOR.

Inocular un ml. de cultivo de vibrios (como se describe en inciso B) dentro de cada uno de tres tubos conteniendo medio líquido de thioglicolato; incubar un tubo en cada una de las siguientes temperaturas : 25°C, 37°C y 42°C, por cinco días. Examinar

los cultivos para ver el crecimiento. C. fetus venerealis crece a 25°C y 37°C, mientras que la mayoría de las cepas de C. fetus intestinalis crecen de 25°C a 42°C.

4) PRUEBA DE PRODUCCION DE H_2S .

Preparar medio semisólido con infusión de Cisteína y carne -- (CBI) o medio con infusión de cerebro y corazón, u otros medios con infusión de carne, de acuerdo a sus instrucciones, excepto que se adicionan 1.5 gr. de agar por litro, y 0.2 gr. de Cistina HCL. por litro antes de envasar el medio. Este es depositado en tubos de cultivo (16 x 160 ml.), con tapón de algodón, después de esterilizar el medio en autoclave durante 15 minutos el medio es almacenado hasta un mes a 4°C antes de desecharlo. Este medio es usado para la prueba de producción de H_2S .

Inocular un ml. de cultivo de vibrios (como se describe en el inciso B). Dentro de un tubo conteniendo medio, inserte una tina de papel filtro impregnada con acetato de plomo dentro del tubo y reponga el tapón de algodón. Registre la producción de H_2S como : (-), (+), (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19), (20), (21), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35), (36), (37), (38), (39), (40), (41), (42), (43), (44), (45), (46), (47), (48), (49), (50), (51), (52), (53), (54), (55), (56), (57), (58), (59), (60), (61), (62), (63), (64), (65), (66), (67), (68), (69), (70), (71), (72), (73), (74), (75), (76), (77), (78), (79), (80), (81), (82), (83), (84), (85), (86), (87), (88), (89), (90), (91), (92), (93), (94), (95), (96), (97), (98), (99), (100). Después de 24 hrs. y nuevamente a los 5 días de incubación. C. fetus venerealis es negativo después de 5 días, mientras que C. fetus intestinalis es negativo a los 24 hrs., pero produce una reacción (++) o (+++) a los 5 días.

5) PRUEBA DE CATALAZA.

Inocular un ml. de cultivo de vibrios (como se describe en el inciso B) dentro de un tubo conteniendo medio de thioglicolato fresco. Después de tres días de incubación, adicionar 10 ml. de H_2O_2 al 3% colocando un tapón de hule con un tubo capilar de vidrio insertado dentro del tubo de cultivo, invertir el tubo y marcar el nivel de líquido. Después de 10 minutos se mide la cantidad de líquido desplazado por el gas. El C. fetus da en promedio una reacción de catalaza de 50 mm. con un rango de 20 a 130 mm.

APENDICE No. 10

MEDIO INHIBIDOR PARA USO EN AISLAMIENTO DE BRUCELLA SPP A
PARTIR DE ESPECIMENES SOSPECHOSOS CONTAMINADOS.

Preparar un litro de agar triptosa o tripticasa soya agar de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Esterilizar en autoclave y enfriar a 50°C.

Adicionar en forma estéril:

1) 6 000 U. Polimixina B

2) 25 000 U. Bacitracina

3) 100 mg. Actidiona

4) 50 ml. de suero bovino negativo a Brucella filtrado y esterilizado.

Mezclar y depositar en cajas de petri estériles. El medio puede ser almacenado en refrigeración y usado hasta 60 días después del preparado.

APENDICE No. 11

PRUEBA DE AGLUTINACION EN PLACA O TARJETA* (1)

El antígeno de placa es una cantidad ajustada arbitrariamente de bacterias, cuando se mezcla una cantidad definida de esta, con cantidades decrecientes en serie del suero a probar, el resultado será similar a los resultados de la prueba de tubo (Apéndice 12). Los resultados de esta prueba, son en general comparables -- con los de la prueba de tubo.

TECNICA PARA CONducir LA PRUEBA DE PLACA.

La placa de la caja de prueba debe ser enfriada ligeramente antes de que la prueba comience. El suero y el antígeno deben ser mantenidos a temperatura ambiente. Con una pipeta serológica mantenida a 45° con respecto a la horizontal, se ponen gotas de .08, .04, 0.02 y .01 ml. de suero en una de las columnas de la placa de prueba. La botella del antígeno se agita ligeramente, se deposita .03 ml. de antígeno de placa sobre cada muestra de suero. Comenzando con la menor cantidad de suero (0.01 ml.), el suero y el antígeno son mezclados cuidadosamente con un dispersor, usando un movimiento circular que distribuya la mezcla en un área de 2 cm. de diámetro. En las siguientes diluciones se incrementa el área de mezclado ligeramente, hasta llegar a tres centímetros, en .03 ml. de dilución. Se levanta la placa ligeramente y se le da un movimiento circular ligero para continuar la dispersión, se coloca nuevamente en la caja y se tapa para evitar la evaporación.

La placa debe guardarse durante ocho minutos antes de hacer las observaciones (muchas muestras alcanzan el pico de aglutinación en ese tiempo). A los cuatro minutos, la placa se debe agitar ligeramente en forma circular. A los ocho minutos se enciende la luz de la caja y se inclina ligeramente, para mantener la mezcla corriendo de lado a lado, mientras se realiza la lectura.

Las observaciones son hechas contra el fondo oscuro de la caja. Solo se hacen tres clasificaciones de la reacción completa (+), incompleta (1) y negativa (-). Cuando en la dilución de 0.01 ó 0.02 ml. ocurre una aglutinación, se debe considerar al suero como positivo. Cuando la aglutinación es incompleta en .02 ml. u-

ocurre al grado de aglutinación en .08 al., esta reacción se considera negativa. Cuando se desea obtener el título específico de suero, se debe realizar la prueba de aglutinación en tubo (Apéndice 12).

* La realización de estas pruebas se hace utilizando la misma metodología. Únicamente en la prueba de tarjeta utiliza una sola muestra de suero, contra cuatro cantidades de suero en la prueba de placa.

APENDICE No. 12

PRUEBA DE AGGLUTINACION EN TUBO (1)

El método descrito en este Apéndice fue desarrollado en el Central Veterinary Laboratory, Weybridge, England.

En vista de la ocurrencia ocasional del Lenbreno "prozona" - se utilizan en forma ordinaria cinco tubos por suero probado. Solución salina normal conteniendo 0.5 % de Lenol es colocada en cada tubo, 0.8 ml. en el primer y 0.5 ml. en cada uno de los restantes. Se pone en el primer tubo 0.2 ml. del suero para prueba y se mezclan adecuadamente. Se toman 0.2 ml. de esta mezcla inicial y se transfieren al segundo tubo, donde se mezclan, y se transfieren 0.5 ml. al tercer tubo, el proceso se continua sucesivamente hasta el último tubo, después del cual, se descartan los 0.5 ml. restantes. Este proceso de doble diluciones resulta en 0.5 ml. de diluciones 1/5, 1/10 etc. Entonces se adicionan 0.5 ml. de antígeno a cada tubo y se mezclan uniformemente dando diluciones finales de 1/10, 1/20 etc.

Estos tubos se incuban en una estufa bacteriológica a 37°C - durante 24 horas y se realiza la lectura.

El grado de aglutinación esta determinado por la lectura -- del grado de claridad antes de agitar los tubos. Así +++ es -- aglutinación y sedimentación casi total, con un 75 % de claridad. ++ es marcada aglutinación y sedimentación, con un 50 % de claridad. + es algo de sedimentación con 25 % de claridad y negativo (-) es difuso y sin claridad. La mayor serodilución que muestre el 50 % de aglutinación o más, es tomada como el título del suero. Debido a la significancia especial que tiene el 50 % de la aglutinación, es recomendable mantener un tubo control con 0.75-ml. de Lenol.

APENDICE No. 13

MEDIO DE CULTIVO PARA TRITRICHOMONAS FOETUS (22).

Solución	Cantidad	
Extracto de carne	3	gr.
Bacto peptona	10	gr.
Agar	0.7	gr.
Cloruro de Sodio	1	gr.
Dextrosa	10	gr.
Penicilina	5 000	UI.
Dihidroestreptomicina	1	mg/ml.
Suero de ovino	30	ml.
Agua destilada	1	Lt.

• Inactivado 30 minutos a 56°C.

Todos los ingredientes excepto el suero de ovino y antibióticos son adicionados a un matraz de tres litros y disueltos por ebullición. Después de enfriarlos, el pH es ajustado a 7.4 con hidróxido de Sodio. La mezcla es esterilizada en autoclave a 15 libras de presión durante media hora, y distribuida asépticamente en cantidades de 10 ml. en viales estériles de 15 ml. con tapa de rosca, e incubada para probar que no está contaminada. Justo antes de usarse se le adicionan el suero de ovino y los antibióticos. El inoculum es cuidadosamente pipeteado en la superficie del medio para minimizar la mezcla. Esto es un paso muy importante, porque las Tritrichomonas migran al fondo del vial, mientras que los hongos y las levaduras tienen a permanecer en la superficie, y el crecimiento bacteriano se concentra media pulgada abajo de la superficie.

Los viales inoculados son incubados de tres a cinco días a 31°C, después de lo cual, una muestra es removida del fondo del tubo con una pipeta Pasteur o una aguja hipodérmica y es examinada microscópicamente.

APENDICE No. 14

TECNICA DE GOMORI PARA HONGOS EN SECCIONES DE TEJIDO
DE IMPRONTAS (22)

Fijación: Formol al 10 %

Técnica: Inclusión en parafina o congelamiento y corte de secciones de 6 micras.

Soluciones:

Acido crómico al 5 %

Acido crómico (CrO_3)	5	gr.
Agua destilada	100	ml.

Nitrato de Plata al 5 %

Nitrato de Plata	5	gr.
Agua destilada	100	ml.

Metenamina al 3 %

Hexametylenetetramina		
USP- $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$	3	gr.
Agua destilada	100	ml.

Borax al 5 %

Borax (fotográfico o USP)		
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	5	gr.
Agua destilada	100	ml.

Solución madre de metenamina-nitrato de Plata

Solución de Nitrato de Plata al 5 %	5	ml.
Solución de Metenamina al 3 %	100	ml.

Se formará un precipitado blanco pero se disuelve inmediatamente por agitación. La solución remanente clara es utilizable durante meses si se mantiene en refrigeración.

Solución de trabajo de metenamina-nitrato de Plata

Solución de Borax al 5 %	2	ml.
Agua destilada	25	ml.
<i>Mezcla y adiciones</i>		
Solución madre de metenamina-nitrato de Plata	25	ml.

Bisulfito de Sodio al 1 %

Bisulfito de Sodio (NaHSO_3)	1	gr.
Agua destilada	100	ml.

Cloruro de oro al 0.1 %

Cloruro de oro al 1 %	10	ml.
Agua destilada	90	ml.
(Puede reciclarse)		

Hipo-tiosulfato de Sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Hipotiosulfato de Sodio	2	gr.
Agua destilada	100	ml.

Solución madre de verde brillante

Verde brillante S.F.	0.2	gr.
Agua destilada	100	ml.
Acido acético glacial ($\text{CH}_3\cdot\text{COOH}$)	0.2	ml.

Solución de trabajo de verde brillante

Solución madre de verde brillante	10	ml.
Agua destilada	50	ml.

PROCEDIMIENTO DE TINCION

A) Correr una laminilla control.

B) Quitar la parafina mediante 2 cambios de Xilol.

C) Pasar a través de alcohol, al 95 %, al 90 % etc. hasta llegar a al agua destilada.

. Aquellas laminillas que fueron previamente tenidas con otros colorantes, en la mayoría de los casos pueden ser usadas quitando los el cubreobjetos en xilol, haciendolas pasar a través de alcohol hasta llegar al agua. El tratamiento subsiguiente con ácido carbónico remueve los colorantes residuales.

D) Oxidar en ácido carbónico (Solución al 5 %) durante una hora.

E) Lavar en agua corriente durante unos segundos.

F) Enjuagar en bisulfito de Sodio al 1 % durante un minuto para quitar cualquier residuo de ácido carbónico.

G) Lavar en agua corriente durante 5 a 10 minutos.

H) Lavar con 3 ó 4 cambios de agua destilada.

I) Colocar en una solución de Nitrato de Plata-melenamina (Solución de trabajo), dentro de una estufa a 50°C - 60°C durante 30 a 60 minutos. Hasta que las preparaciones tomen un color amarillo -

café (usar pinzas impermeabilizandas en parafina para secar las laminillas de esta solución).

J^o Sumergir en agua destilada, observarlo al microscopio para determinar si hubo impregnación adecuada de plata (los hongos deberán tener un color café en este momento).

K^o Enjuagar en seis cambios de agua destilada. Armonizar los colores con una solución de cloruro de oro al 0.1 % por un periodo de 2 a 5 minutos.

L^o Enjuagar con agua destilada.

M^o Retirar la plata que no fue reducida, utilizando una solución de hiposulfato de Sodio al 2 % durante 2 a 5 minutos.

N^o Hacer una tinción de contraste con una solución de verde brillante durante 30-45 segundos.

O^o Deshidratar con alcohol absoluto, aclarar con 2 ó 3 cambios de Xilol y montar el cubreobjetos.

RESULTADOS

Esta técnica se da a todas las estructuras de hongos, incluyendo los filamentos de Actinomyces boydii y Nocardia stereoides una coloración café negruzca. Al teñir hongos, especialmente los filamentos de Nocardia, se ha encontrado que el tipo de exposición ante la solución nitrato de plata-metanamina para obtener una tinción completa puede variar de acuerdo con el tipo y o cepas de que se sospecha. Por lo tanto, si se sospecha de Nocardia se deberán procesar dos laminillas, una durante 60 minutos y otra durante 90 minutos, en esta forma se asegura el que se pueda obtener una demostración positiva de cualquier grupo de filamentos de Nocardia que puedan estar presentes. Las laminillas previamente teñidas con otras coloraciones en la mayoría de los casos pueden ser teñidas de nuevo, para lo cual se les deberá quitar el cubreobjetos sumergiéndolas en Xilol y después pasarlas a través de alcohol y el tratamiento subsiguiente con ácido crómico removerá cualquier colorante residual.

APENDICE No. 15

TINCION DE GRIDLEY PARA HONGOS (21)

Fijación: Formalina neutral bufferada al 10 %.

Técnica: Cortes de secciones de tejidos de 6 micras de espesor, incluidas en parafina.

SOLUCIONES

Solución de Acido crómico al 4 % (Trióxido de cromo).

Acido crómico 4 gr.

Agua destilada 100 ml.

Solución de Foutyent-Coleman.

Disolver 1 gr. de Fucsina básica en 200 ml. de agua destilada caliente, llevar a punto de ebullición, enfriar y adicionar 20 gr. de metabisulfito de potasio, y 10 ml. de ácido clorhídrico normal. Dejar decolorar durante 24 hrs., agregar 0.5 gr. de carbón activado, agitar durante un minuto, filtrar a través de un papel filtro ordinario, repetir la filtración hasta que la solución se decolore. Almacenar en refrigeración.

Solución de Aldehído-Fucsina.

Fucsina básica 1 gr.

Alcohol al 71 % 200 ml.

Acido clorhídrico concen. 2 ml.

Acido

Paraldehído 2 ml.

Mantener a temperatura de laboratorio durante dos o tres días, o hasta que la tinción adquiera un color púrpura fuerte.

Solución de Amarillo de Metanil al 0.25 %.

Amarillo de metanil 0.25 gr.

Agua destilada 100 ml.

Acido acético glacial 0.25 ml.

METODO DE TINCION: (Utilizando una laminilla control)

- 1) Remover la parafina e hidratar con agua destilada.
- 2) Oxidar en ácido crómico al 4 % durante una hora.
- 3) Lavar en agua corriente durante 5 minutos.
- 4) Poner en reactivo de Feulgen-Coleman durante 15 minutos.
- 5) Lavar en agua corriente durante 15 minutos.
- 6) Enjuagar en alcohol al 70 % varias veces.
- 7) Poner en solución de tinción de Fucsina durante 30 minutos.
- 8) Enjuagar el exceso de tinción con alcohol al 95 %.
- 9) Enjuagar en agua destilada.
- 10) Teñir ligeramente con una solución de contraste (amarillo de -
melanil, durante un minuto).
- 11) Enjuagar en agua destilada.
- 12) Deshidratar en alcohol al 95 %, alcohol absoluto, y aclarando-
en Xileno (hacer dos cambios de cada uno).
- 13) Montar la muestra.

RESULTADOS

Micelios, color púrpura profundo

Conidias, color rosa profundo a púrpura

Fondo, color amarillo

Los tejidos elásticos y la musina, también se tiñen de color -
púrpura.

OBSERVACION

El detalle morfológico de las estructuras de las levaduras y -
las hifas son comúnmente visibles; aunque los hongos muy viejos, -
los cuales probablemente ya no eran viables en el momento de la -
tinción, no son también teñidos como la técnica de Gacott. Los fi-
lamentos de Nocardia y Actinomicetes no son teñidos por este método.

APENDICE No. 16

TINCION ACIDO-PERIODICO DE SCHIFF (1881).

Fijación: Formalina al 10 %, o solución de Zenker.

Técnica: Cortes de secciones de tejidos de 6 micras de espesor, incluidas en parafina.

SOLUCIONES

Solución de Fuchsin-Coleman

Disolver un gr. de Fucsina básica en 200 ml. de agua destilada - caliente llevar a punto de ebullición. Enfriar y agregar dos gr. de metabisulfito de Potasio, y 10 ml. de ácido clorhídrico Normal. Dejar decolorar durante 24 hrs., adicionar 5 gr. de carbón-activado. Agitar un minuto y filtrar a través de papel filtro ordinario. Repetir la filtración hasta que la solución este decolorada (Almacenar en refrigeración).

Solución Leuco-Fucsina de Schiff.

Disolver un gr. de Fucsina básica en 200 ml. de agua destilada caliente, llevar a punto de ebullición. Enfriar a 50°C, enfrías y agregar 20 ml. de ácido Clorhídrico Normal. Enfriar más y agregar un gr. de bisulfito de Sodio Anhidro, o metabisulfito de Sodio. Mantener en oscuridad durante 48 horas o hasta que la solución se vuelve color paja (Almacenar en refrigeración).

Prueba para la solución Leuco-Fucsina de Schiff.

Ventir algunas gotas de la solución de Schiff en 10 ml. de formaldehído al 27-40 % en un vidrio de reloj. Si la solución se vuelve rojiza rápidamente, la solución es buena. Si la reacción se tarda y el color resultante es azul púrpura, la solución no sirve.

Solución de Acido Periódico al 0.5 %

Cristales de Acido Periódico 0.5 gr.

Agua destilada 100 ml.

Solución de Acido Clorhídrico Normal.

Acido clorhídrico concentrado S.P. 1.1983 0.5 gr.

Agua destilada 916.5 ml.

Tinción de contraste verde brillante al 0,2 %	
Cristales de verde brillante	0,2 gr.
Agua destilada	100 ml.
Acido acético glacial	0,2 ml.

METODO DE TINCION:

- 1) Inmersión en Xileno
- 2) Inmersión en alcohol absoluto
- 3) Inmersión en alcohol al 95 %
- 4) Si el fijador es Zenker, remover el precipitado de mercurio en yodo, lavar en agua y decolorar en solución aclaradora de cloro.
- 5) Enjuagar en agua destilada
- 6) Poner en solución de Acido Peribico durante 5 minutos
- 7) Enjuagar en agua destilada
- 8) Poner en solución de Feulgent-Coleman o solución de Leuco-Fucsina de Schiff durante 15 minutos
- 9) Poner en agua corriente durante 10 minutos para desarrollar un color rosa
- 10) Inmersión en tinción de contraste verde brillante durante algunos segundos
- 11) Alcohol al 95 %, 2 cambios
- 12) Alcohol absoluto, 2 cambios
- 13) Xileno, 2 cambios
- 14) Montar la muestra

NOTA: Una solución de cloro acuoso disminuye la sobre tinción por la Leuco-Fucsina. El agua corriente decolora el verde brillante.

RESULTADOS:

El glicogeno, la mucina, el ácido hialurónico, la fibrina de los trombos, las gotas coloidales, la hialina de la arteriosclerosis, los depósitos hialinos en glomérulos, las células granulares en las arteriolas renales, la mayoría de las membranas basales, -- los coloides del tallo pituitario y tiroides, la infiltración amiloidea y otros elementos pueden mostrar una reacción positiva que va de rosa a rojo púrpura!

A) Los nucleolos son de color azul

- B) Los hongos son de color rojo

El fondo es de color verde pálido debido a la tinción de contraste, que es verde brillante.

APENDICE No. 17

EXAMEN DIRECTO DE TEJIDOS PARA BUSCAR NICELIOS (3).

Raspar una pequeña cantidad de tejido a partir de la muestra problema y dispersarla en un porta objetos. Agregar una o dos gotas de hidróxido de potasio al 10 % a la impronta y cubrir con un cubreobjetos. Permitir que el tejido se digiera durante 10 a 15 minutos a temperatura de laboratorio. Si el tejido de la muestra contiene grandes cantidades de queratina, la digestión puede requerir más tiempo, el portaobjetos puede ser calentado ligeramente sobre la flama de un mechero para acelerar la digestión. Examinar la preparación para buscar nicelios usando un aumento de 100 X con luz suave.

APENDICE No. 18

CULTIVO DE MUESTRAS PARA HONGOS (36).

La muestra más comúnmente utilizada para el cultivo de hongos es el contenido atomasal, el cual es obtenido por punción de la pared atomasal con una aguja hipodérmica estéril, y extrayendo algo de líquido dentro de una jeringa estéril. Cuando se están preparando la piel y la placenta para cultivo, estos tejidos deben ser lavados cuidadosamente en agua limpia. Entonces la superficie de una lesión en piel es raspada con un bisturí estéril, y una pequeña cantidad de la sustancia obtenida del raspado es dispersada sobre la superficie de un medio de cultivo. Un cotiledón es -- cortado desde su lado fetal hasta su lado materno, y la superficie cortada es raspada con una hoja de bisturí esterilizada, de modo que se obtenga una cantidad representativa de todo el espesor del tejido. Este material es utilizado para inocular medio Sabouraud y medio Mycologic en forma doble. Una placa es incubada a 37°C y la otra a 25°C. Ordinariamente el crecimiento de los hongos que causan aborto, es rápido, y las placas deben ser examinadas cada 24 hrs. durante una semana. Las colonias deben ser transferidas a dextrosa agar papa para el almacenamiento e identificación de las mismas.

La identificación de la mayoría de los aislamientos es fácilmente hecha mediante el examen de pequeñas cantidades de hongos tenidas con Lactofenol y algodón azul.

APENDICE No. 19

MEDIO SELECTIVO ENRIQUECIDO DE TRANSPORTE (SET)
(19).

AGAR CARNE	10 ml
5 FLUOROURACIL	300 g/ml
VERDE BRILLANTE	50 g/ml
CICLOHEXAMIDA	100 g/ml
SULFATO DE POLINIXINA	100 U l/ml

Esterilizados en un tubo de cultivo de 18 milímetros por 142 milímetros.

APENDICE No. 26

TECNICA DE SERONEUTRALIZACION DE IBR (26)

1. Inactivar los sueros problema a 56°C durante 30 minutos.
2. Colocar en las placas de microtitulación 0,050 ml. de medio -- F-15 con 6 % de suero fetal de ternero en cada pozo.
3. Cargar los microdilutores de 25 con el suero problema y agitar en la primera línea. Se cargan los microdilutores nuevamente, con previa esterilización y enfriamiento con el mismo suero problema y a partir de la segunda línea de pozos se hacen diluciones triples seriadas desde 1:3 hasta 1:2187.
4. Agregar 0,050 ml de la suspensión de virus previamente titulada a todas las diluciones del suero.
5. Hacer al mismo tiempo un control de virus y control negativo.
6. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
7. Agregar 0,050 ml. de una suspensión de células BT ajustada a una concentración de 10,000 a 12,000 células por cada 0,050 ml.
8. Incubar a 37°C en una atmósfera húmeda y con 2 % de CO₂ durante 5 días.
9. Leer inhibición del efecto citopático (ICP).

APENDICE No. 20
TITULACION DEL LOTE DEL VIRUS DE IOR

1. Hacer diluciones del virus de 10^0 a 10^{-8} con medio F-15 sin suero.
2. Colocar en placa de microtitulación 0,10 ml. de medio F-15 -- con 6 % de suero fetal de ternera (irradiado e inactivado), -- en cada pozo.
3. Cargar los microdilutores de 50 . con cada dilución del virus y agitar en la primera línea, a partir de esta línea se hacen diluciones seriadas hasta la última línea de la microplaca. Se utilizan cuatro hileras por cada dilución.
4. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
5. Agregar 0,050 ml. de una suspensión de células BT (turbinadas de Bovino), ajustada a una concentración de 10, 000 a 12, 000 células por cada 0,050 ml.
6. Se debe dejar una serie de cuatro hileras sin agregar virus -- para control negativo.
7. Incubar a 37°C en una atmósfera húmeda y con 2 % de CO_2 durante 5 días.
8. A los 5 días leer inhibición del efecto citopático.

APENDICE No. 21

TECNICA DE SERONEUTRALIZACION DE BVD (261).

1. Inactivar los sueros problemas a 56°C durante 30 minutos.
2. Colocar en las placas de microtitulación 0.050 ml. de medio -- F-15 con 6 % de suero fetal de ternera en cada pozo.
3. Cargar los microdilutores de 25ml con el suero problema y agitar en la primera línea. Se cargan los microdilutores nuevamente de, con previa esterilización y enfriamiento con el mismo suero problema y a partir de la segunda línea de pozos se hacen diluciones triples seriadas desde 1:1 hasta 1:2187.
4. Agregar 0.050 ml. de la suspensión de virus previamente titulada a todas las diluciones del suero.
5. Hacer al mismo tiempo un control de virus y control negativo.
6. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
7. Agregar 0.050 ml. de una suspensión de células B7 ajustada a una concentración de 10,000 a 12,000 células por cada 0.050 ml.
8. Incubar a 37°C en una atmósfera húmeda y con 2 % de CO₂ durante 5 días.
9. Leer inhibición del efecto citopático (ECP).

APENDICE No. 21

TITULACION DEL LOTE DE VVO

1. Hacer diluciones del virus de 10^0 a 10^{-8} con medio F-12 sin suero.
2. Colocar en placas de microtitulación 0.10 ml. de medio F-12 con 6 % de suero fetal de ternera liofilizado e inactivado, en cada pozo.
3. Cargar los microdilutores de 50 ml., con cada dilución del virus y agitar en la primera línea, a partir de esta línea se hacen diluciones seriadas hasta la última línea de la microplaca. Se utilizan cuatro hileras por cada dilución.
4. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
5. Agregar 0.050 ml. de una suspensión de células BT (linfocitos de Bovinos), ajustada a una concentración de 10,000 a 12,000 células por cada 0.050 ml.
6. Se debe de dejar una serie de cuatro hileras sin agregar virus para control negativo.
7. Incubar a 37°C en una atmósfera húmeda y con 2.5 de CO_2 durante 5 días.
8. A los 5 días leer efecto citopático (EC%).

APENDICE No. 22

PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

PI-3 (264).

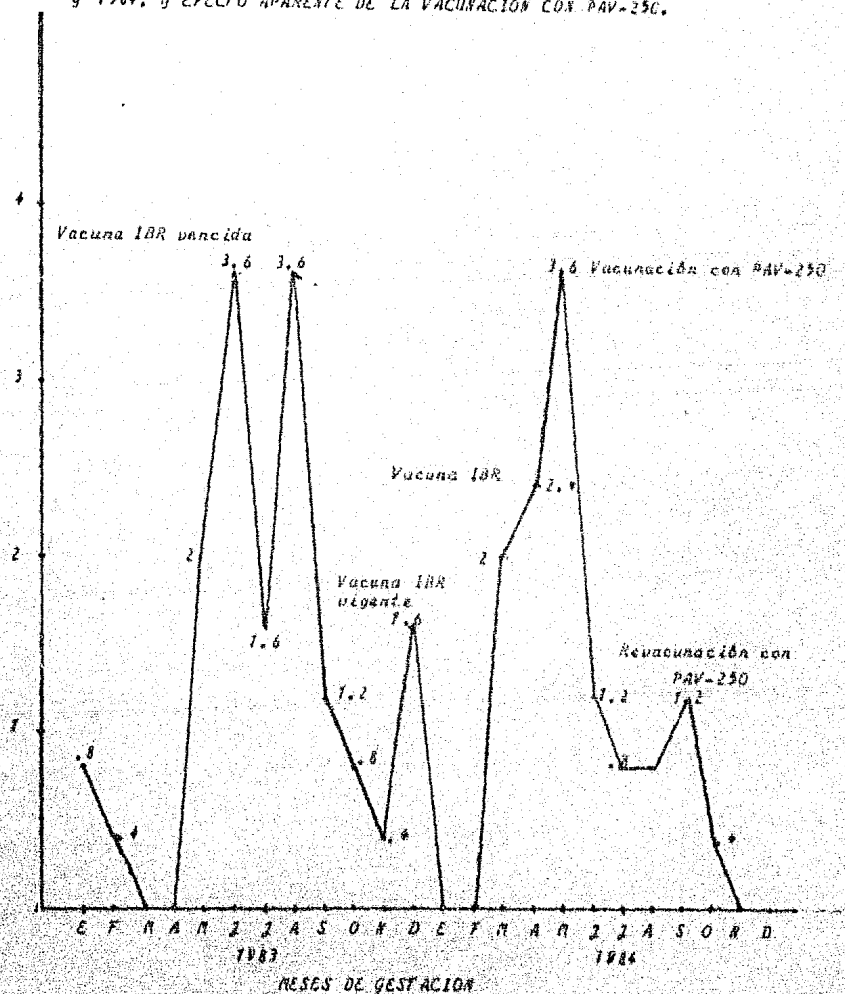
1. Diluir el suero 1:10 con PBS e inactivado a 60°C durante 20 minutos.
2. Tratar cada suero con 0.02 g. de Kaolin lavado en ácido durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar 15 minutos a 1500 rpm.
4. El suero control positivo se diluye 1:20 y el control negativo 1:10.
5. Adicionar 0.025 ml. de PBS en todos los pozos, excepto en la primera línea vertical de pozos de la placa se coloca con el lado corto hacia el operador.
6. La primera línea horizontal de pozos son para control de suero.
7. Adicionar 0.025 ml. de suero inactivo en la primera, segunda y última línea de la placa.
8. Realizar diluciones dobles comenzando con el segundo pozo, usando diluciones de 0.025 ml, no tocar los sueros control.
9. Adicionar 0.025 ml. del virus diluido de tal manera que contenga 4 a 8 unidades hemaglutinantes.
10. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
11. Después agregar 0.05 ml. de una suspensión de eritrocitos de bovino, diluidos 1:240.
12. Incubar a 40°C toda la noche.
13. Leer al día siguiente.

TABLA No. 1

CARACTERISTICAS DE VIBRIOS COMUNMENTE AISLADOS EN ANIMALES

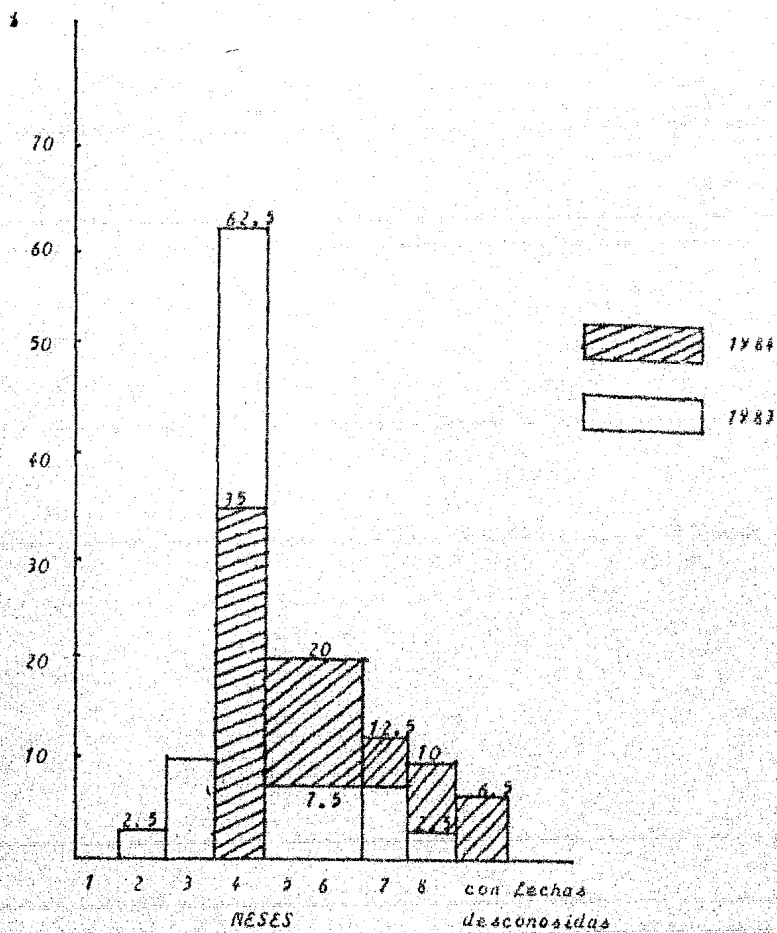
ESPECIE	HABITAT NATURAL	PAATOGENICIDAD	CATALASA	H ₂ S	SENSIBILIDAD A PENICILINA
1. <u>Vibrio felus:</u>					
a. <u>venerealis</u> (1)	Tracto genital bovino	Infertilidad y aborto	+	-	+++
b. <u>venerealis</u> (sub-1)	Tracto genital bovino	Infertilidad	+	++	+++
c. <u>intestinalis</u>	Tracto genital bovino	Aborto	+	++	+
2. <u>Vibrio angulus</u>	Tracto genital bovino y ovino	Ninguna	-	++++	+++
3. <u>Vibrio coli</u>	Disenteria intestinal suino		+	+++	----
4. <u>Vibrio fœcalis</u>	Tracto intestinal ovino y bovino	Desconocido	+	+++	++++

PORCENTAJES MENSUALES DE ADORTOS DURANTE LOS AOS DE 1983
Y 1984, Y EFECTO APARENTE DE LA VACUNACION CON PAV-250.



GRAFICA No. 2

PORCENTAJES DE ABORTOS POR MES DE GESTACION EN LOS AÑOS
DE 1983 Y 1984.



CUADRO No. 1

CAUSAS MAS IMPORTANTES DE DESECHO DEL GANADO BOVINO EN
MEXICO.

CAUSA	No.	(%)
Apto. reproductor	422	56.89
Enf. infecciosas	154	13.10
Incosteabilidad economica	100	8.51
Apto. digestivo	60	5.10
Apto. respiratorio	30	2.55
Apto. circulatorio	30	2.55
Traumatismo	11	0.94
Neoplasias	5	0.42
Parasitarias	3	0.25
Metabolicas	2	0.17
Vias urinarias	2	0.17
Diversas	8	0.68
Desconocidas	18	1.61
TOTAL	1175	100.00
(664)		

CUADRO No. 2

COMPARACION DE DATOS DE BOVINOS DESECHADOS EN DIFERENTES
PAISES

CAUSA	INGLATERRA	E.U.A	AUSTRALIA	ALEMANIA
Infertilidad	3.3 %	16-19 %	6.1 %	28-31 %
Aborto		1-5 %		
Reprod.				
Ent. de O. gl				
Ent. Cont.				
Tuberculosis				34.5 %
Bruceosis				
P. ubre		13.9 %	6.1 %	
B. prod.	6.7 %	26.4 %	44.5 %	10.2 %
Edad	1.7 %	4.2 %	16.4 %	3.9 %
Timpanismo				
Desc.	4.8 %	1.7 %		
Accidente	6.0 %	10.5 %		
Muerte		1.1 %		
Desc. len		10.5 %		
Prod. l.		16.9 %		
Secas				11.0 %
7 Enfermedades de órganos genitales				
(66)				

CAUSA	CANADA	ITALIA	INDIA	HUNGRIA
Infertilidad		37-50 %		46.51 %
Aborto	13.4-24 %	10.47 %		
Reprod		28.00 %	7.85 %	
Enf. de O. G.				
Enf. cont.				
Tuberculosis				
Bruceosis			13.29 %	
P. uree				
B. prod.	28.3-55 %	38.00 %	41.09 %	8.53 %
Edad		2.3 %	14.2 %	
Timpanismo				
Desc.		31.00 %	2.42 %	
Accidente				
Muerte				
Desc. fen.				
Prop. L.				
Secas				

CAUSA	RUSIA	MEXICO
<i>Infertilidad</i>	7.5 %	45.9 %
<i>Aborto</i>		10.29%
<i>Reprod.</i>		
<i>Enf. de O.G.</i>	19.2	
<i>Enf. cont.</i>	6.1 %	
<i>Tuberculosis</i>		7.23%
<i>Bruceosis</i>		0.47%
<i>P. ubre</i>	10.9 %	2.63%
<i>D. producción</i>	15.6 %	7.9 %
<i>Edad</i>	11.8 %	0.5 %
<i>Timpanismo</i>	5.3 %	2.6 %
<i>Desc.</i>	24.2 %	6.72%
<i>Accidente</i>		
<i>Muerte</i>		
<i>Desc. len.</i>		
<i>Paen. l</i>		
<i>Secas</i>		

CUADRO No. 3

AGENTES ETIOLOGICOS QUE PRODUCEN PROBLEMAS REPRODUCTIVOS

EN BOVINOS

BACTERIAS	PARASITOS	VIRUS
11. <u>Brucella abortus</u>	11. <u>Toxoplasma gondii</u>	56. IBR
11. <u>Leptospira</u> (varias especies)	11. <u>Teladorsagia circumcincta</u>	56. BVD
11. <u>Campylobacter</u>	11. <u>Trichostrongylus axei</u>	11. PI-3
11. <u>Clostridia</u>	14. <u>Anaplasma marginale</u>	11. <u>Escherichia coli</u>
11. <u>Corynebacterium</u>	51. <u>Sarcocystis murina</u>	37. 49. Lengua azul
11. <u>Listeria</u>	51. <u>Sarcocystis equorum</u>	24. Enterovirus
11. <u>Escherichia coli</u>	51. <u>Sarcocystis hominis</u>	24. FCV
11. <u>Mycobacterium</u> spp	51. <u>Babesia bovis</u>	12. Parvovirus bovino (CAP)
11. <u>Mycobacterium</u> spp	51. <u>Babesia biguttata</u>	24. Enterovirus
11. <u>Neisseria</u>	51. <u>Babesia leishmanii</u>	24. V. de Vassalation
11. <u>Pasteurella</u>		51. Alacana
11. <u>Pseudomonas</u>		24. Peste bovina
20. <u>Staphylococcus</u>		24. Fiebre aftosa
20. <u>Streptococcus</u>		12. DM 599
11. <u>Ureaplasma</u>		4. Haapas Bovino Lipo 4
11. <u>Haemophilus somni</u>		4. Moun 33/63
20. <u>Salmonella</u>		

HONGOS

AGENTES NO INFECCIOSOS

65. <u>Aspergillus</u>	44. <u>Genéticas</u>
11. <u>Mucor</u>	45. <u>Traumáticas</u>
11. <u>Ascidia</u>	45. <u>Fémicas</u>
	45. <u>Nutricionales y Tóxicas</u>

* NOTA: No. de Referencia

Milantos y Milantos
 Deficiencia de V. A
 Deficiencia de V. C
 Aguja de pino
 Astragulus
 Manzanera

CUADRO No. 4

SEROGRUPOS DE LEPTOSPIRAS ESTUDIADOS

L. autumnalisL. pomonaL. australisL. icterohaemorrhagiaeL. latoviaeL. seiseL. canicolaL. pyrogenesL. helidomadisL. grippolyphaga

CUADRO No. 5

PORCENTAJES DE ABORTO POR MES DE GESTACION EN LOS
AÑOS DE 1983 Y 1984

AÑO 1983:

MES DE GESTACION	PORCENTAJES
2 meses	2.5 %
3 meses	10 %
4 meses	68.5 %
5 meses	7.5 %
6 meses	7.5 %
7 meses	7.5 %
8 meses	2.5 %

AÑO 1984:

MES DE GESTACION	
4 meses	35 %
5 meses	20 %
6 meses	20 %
7 meses	12.5 %
8 meses	10 %
Desconocidos	6.5 %

RESULTADOS DE LOS TÍTULOS DE LA PRUEBA DE SEROCONVERSIÓN E INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN.

VACA	REGISTROS		ABORTO meses edad feto	TÍTULOS		TÍTULOS		TÍTULOS	
	1 ^{ra} aun.	2 ^{da} aun.		128		64		n1-3	
1863	255	726	no	0	8	10	0	0	0
7	260	792	0,5	0	8	-0	10*	0	0
219	499	085	8,7	2	16	-0	10*	0	0
130	284	745	2,4	32	128	0	0	0	0
82	292	698	no	32	128	0	0	0	0
1876	383	717	0,4	16	64	10	10	2	2
37	444	723	no	16	64	10	10	0	2
1384	433	676	0,4	2	8	10	10	2	0
128	540	737	10,6	8	32	10	0	0	0
1872	244	584	no	8	16	10	10	0	0
101	361	710	11,4	64	128	10	10	2	0
207	440	689	no	16	256	0	0	0	0
236	454	759	8,4	4	64	10	0	2	0
211	548	695	12,4	0	256	0	0	0	0
1498	452	732	5,4	4	8	10	0	2	2
154	492	725	no	16	32	0	0	0	0
46	270	711	no	16	16	0	0	0	0
206	274	742	9,4	16	16	0	0	0	0
152	278	678	no	32	32	0	0	0	0
180	281	735	no	32	32	10	0	0	0
56PB	298	715	7,4	32	32	0	10*	0	0
1841	300	704	no	256	256	0	0	0	0
242	313	719	no	32	32	0	0	0	0
1879	354	722	no	32	32	10	10	2	2
221	381	690	1,4	4	4	0	0	0	0
1875	389	733	no	16	16	0	0	0	0
3/N	426	679	12,4	128	128	10	10	0	0
56	417	700	8,5	32	32	0	0	0	0
176	423	744	8,6	32	32	10	20*	2	0
116	427	703	1,4	32	32	0	0	0	0

a. Hué seroconversión de cuatro diluciones dobles.

155	422	707	8.5	8	8	0	0	0	0
3	484	706	6.3	4	4	10	0	0	2
73	523	677	no	8	8	0	10	0	0
224	500	728	8.4	32	32	0	0	0	0
43	534	718	no	32	32	10	0	0	0
67P	535	697	8.3	32	32	0	0	0	0
91	537	708	5.4	256	256	0	0	0	0
3PB	316	749	no	32	32	0	0	0	0
131	280	753	10.4	32	32	0	0	0	0
146	237	738	5.4	256	64	0	0	0	0
186	242	736	no	64	8	10	0	0	0
1862	102	720	no	4	2	0	0	0	0
18PB	309	731	no	32	4	0	0	0	0
19PB	343	741	9.9	256	128	0	0	0	0
12A	334	705	5.4	4	2	20	10	2	2
55	344	693	8.4	256	2	10	10	0	0
200	348	713	12.3	16	4	10	0	0	0
186	9353	688	no	128	64	0	0	0	0
210	364	734	7.3	16	4	10	0	0	0
29	37	746	5.4	256	32	10	20	0	0
158	374	743	6.2	128	32	0	0	0	0
104	382	716	no	32	16	0	0	0	0
1851	384	699	no	64	32	0	0	0	0
135	408	691	10.4	32	4	0	0	0	0
205	455	684	12.4	256	16	0	0	0	0
77	458	701	6.7	32	16	20	20	0	0
105	473	687	8.7	32	16	10	10	0	2
39	482	683	no	2	0	10	20	2	0
84	483	799	8.4	16	8	20	10	2	2
136	489	714	7.4	16	32	0	0	0	0

CUADRO No. 7

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE "T" PARA ANALISIS
DE GRUPOS.

	IBR	BVD	PI-3
GRUPO CON AUMENTO DE ANTICUERPOS	p7.05	SDS*	p7.05
GRUPO CON PERMANENCIA DEL TITULO DE ANTI- CUERPOS	SDS	SDS	SDS
GRUPO CON DISMINUCION DEL TITULO DE ANTI- CUERPOS	SDS	SDS	SDS

* Sin diferencia significativa.

CUADRO No. 8

RESULTADOS EN LA DETERMINACION DE AFLATOXINA B₁, ZEARALE
NONE Y NICOTOXINA T₂.

MUESTRA	ANALISIS		
	Aflatoxina B ₁	Zearalenone	Nicotoxina T ₂
Maiz	-	-	-
Salvado lote 1	-	-	-
Salvado lote 2	-	-	-
Granillo	-	-	-
Songo*	0.4 ppb	-	-
Cemita	-	-	-

* Cantidades arriba de 300 ppb de aflatoxina B₁ son causantes de abortos.

B I B L I O G R A F I A

1. Atton, G. G., and Jones, L., 1993, Laboratory techniques in myceliosis, Animal Health Branch Monograph, No. 7, pp. 1-46.
2. Addition of Neomycin to Control Contaminants., 1983, Applied Microbiology., 25: 761-766.
3. Ajello, L. et al., Laboratory Manual for Medical Mycology U.S.-Dept. of H.E.W., C.D.C. Atlanta., GA. 20234.
4. Avila, G. J. 1983. Programa práctico de Medicina Preventiva en un hato lechero con énfasis en abortos. IX Congreso Nacional -- de Buiatria, Puebla, pp. 299-305.
5. Bittle, J., and Cronnell, R., 1981, Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine viral diarrhoea, in Bovine Medicine and Surgery, Edited by H.C. Anstud, American Press, pp. 125-175.
6. Blood and Henderson., 1974 Veterinary Medicine. 4o. Edition --- Bailliere Tindall, Williams and Wilkins Company., Baltimore --- MacMillan Publishing Company Inc., New York, pp. 374-379.
7. Brown, L. W., 1982, Bovine Reproductive Disorders: An Approach to Diagnosis, The Bovine Proceeding, No. 14, April, pp. 16-18.
8. Bynner John H., 1975. Vibrio fetus-Induced Abortion, Laboratory Diagnosis of Bovine Abortion. Edited by Clyde A. Kirkbride, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp. 38-47.
9. Butler John E., 1981, The Ruminant Immune System. Associate Editors: J. Robert Duncan and Klaus Nielson. Plenum Press, pp. --- 721-753.
10. Castaneda J. R., Escobar J. A., Berruecos J.M., 1971. Péndidas-

- por problemas reproductores: II. Efecto de la edad al primer punto en los espacios interpartos subsecuentes en ganado Holstein. *Técnica Pecuaria en México*, 20:2-14.
11. Correa, J. P., 1962. *Enfermedades Virales de los Animales Domésticos (Poligástricos)*. Vol. 2, 4a. Edición, pp. 12-12.
 12. Correa, J. P., 1963. Aborto producido por IBR, BVD, PI-3 y Parvovirus y BN 599. IX Congreso Nacional de Buiatría, Puebla., - pp. 96-98.
 13. Correa, J. P., Brown D.L.S., Baynes PH. D. J.H., 1974, Presencia de Anticuerpos contra Rinotraqueitis Infecciosa, Diarrea Viral Bovina, Parainfluenza 3, Brucelosis, Leptospirosis, Virriosis y Haemophilus somnus en sueros de bovinos con problemas patológicos reproductivos y respiratorios. *Técnica Pecuaria en México*, 26:36.
 14. Correa U., M., Correa C. H. N., and Gottschalk A. F., 1978. Bovine abortion associated with *Anaplasma marginale*. *Can. J. comp. Med.*, Vol. 42, April, pp. 227-228.
 15. De Quevedo J.M., Aguilar S. A., y Benavides J. M., 1978. Algunos Aspectos Epidemiológicos de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. *Técnica Pecuaria en México*, No. 34: pp. 67-68.
 16. Escutia S. I., 1983. Técnica para el Muestreo y Cultivo de Tritrichomonas foetus del ganado bovino., IX Congreso Nacional -- de Buiatría, Puebla, pp. 277-281.
 17. Ellinghausen, H. C., Jr., and McCullough, W. G.: Nutrition of Leptospira pomona and Growth of 13 other Serotypes: Fractionation of Oleic albumin Complex and Medium of Bovine Albumin --- and Polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.*, 23 (1962): 42-51.
 18. Fletcher, W., 1957. Leptospirosis, Tsutsugamushi disease and - tropical typhus in Federated Malay States. *Trans. Roy. Soc. -- Trop. Med. and Hyg.* 21:265.

17. Foley J. W., Baynes J. H., D. E., and Barstad R.E., Improved Method for Diagnosis of Campylobacter fetus infection in cattle using Selective Enrichment transport Medium., National Animal Disease Center, Agricultural Research, Science and -- Education Administration, U.S. Department of Agriculture, - Ames IA, 20010.
20. Gillespie, J. H. and Timoney, J.F., 1981, Infections Diseases of Domestic Animals, Cornell University Press, 7a. Edition, - pp. 64-70.
21. Gridley, H. F., 1953, Method for Fungi, Am. J. Clin. Path. - 231 pp. 307-307.
22. Grocott, R. G., 1975, Gomori's Methenamine-Silver Nitrate -- Technic for Fungi in Tissue Sections and Smears, Am. J. Clin. Pathol. 27:175-179.
23. Hall, G. A., and Jones P. W., 1976, An experimental study of Salmonella dublin abortion in cattle, Br. Vet. J., Vol. 132, No. 60, pp. 60-63.
24. Hernández B. E., 1983, Otras virosis productoras de abortos. IX Congreso Nacional de Bucalnia, Puebla, pp. 276-278.
25. Homen D. C., D. V. M., 1978, Bovine Virus Diarrhea (BVD) --- Vaccination, Veterinary Clinical Sciences Bldg, Kansa State University, pp. 152-153.
26. Jenney, E. W., and Snyder, M. L., 1981, Microtitration Serology Methods for Bovine Virology in Serologic Microtitration Techniques, U.S. Department of Agriculture, AMES, Iowa, pp. - 37-38.
27. Jennet, Ian. V., McNaist Steven, Waddington John, Jeffrey W. Malecki C. Jack and McCausland Ian P., 1984, Diagnostic Studies of the fetus, placenta and maternal blood from 265 bovi

ne abortions, Cornell Vet., 74:6-20.

28. Jones T. O., 1977. Nitrate-nitrite poisoning of cattle from legume crops, the Veterinary Record, 101:266-267.
29. Karhs R. F., and Thorsen Jan., 1982. Interpretation of serologic test for bovine viral diseases. The Bovine Proceeding No. 18, April, pp. 117-119.
30. Kendrick J. W., 1967. The vaginal mucus agglutination test for bovine vitriosis, J.A. M. A., 120 pp. 475-478.
31. Kendrick, J. W., 1969. Bovine Viral Diarrhea Virus-Induced -- Abortion. Laboratory Diagnosis of Bovine Abortion, Edited by Clyde A. Kirkbride, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp. 7-3.
32. Kendrick, J.W., 1970. Epizootic Bovine Abortion, Laboratory -- Diagnosis of Bovine Abortion, Edited by Clyde A. Kirkbride, - American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp. 9-11.
33. Kendrick, J. W., 1969. Tritrichomonas foetus-Induced abortion Laboratory Diagnosis of Bovine Abortion, Edited by Clyde A. - Kirkbride, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp. 64-62.
34. Kirkbride, C. A., 1965. Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Induced abortion, Laboratory Diagnosis of Bovine Abortion Edited by Clyde A. Kirkbride, pp. 4-8.
35. Kirkbride, C. A., 1965. Laboratory Diagnosis of Bovine Abortion caused by various species of bacteria, Laboratory Diagnosis - of Bovine Abortion, Edited by A. Kirkbride, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp. 48.
36. Kirkbride, C. A., 1978. Mycotic Abortion, Laboratory Diagnosis

- of Bovine Abortion, Edited by Clyde A. Kirkbride, American -- Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp. 49-59.
37. Liendo, G. and Castro E. A., 1981. Bluetongue in cattle: Diagnosis and virus isolation. *The Bovine Practitioner*, No. 16, - November, pp. 87-95.
 38. MacManus, J. F. A., 1949. Periodic Acid-Schiff Reaction (A.-F. I. P. Modification), *Stain Technol.* 23:99.
 39. Martel, J. L. et Fedida M., 1979. Les avortements infectieux non bactériologiques des bovins, Rôle des Bactéries, *Bull. Soc. - Sci. Vet. et Med. Compiègne Lyon*, Vol. 81, No. 2, pp. 111-116
 40. Mashat, R. R., 1980, Campylobacter spp in enteric lesions in cattle, *Veterinary Record*, No. 107, pp. 31-34.
 41. Mejía, J. L. y Juanillo L. I., 1979. Pléridas económicas -- por Brucelosis en el ganado Lechero de Querétaro, Tesis Profesional, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.A. A. M., Mex.
 42. Mellick, P. O., Winter A. J., and McEntee K., 1965. Diagnosis of vibriosis in the bull by use of fluorescent antibody-Technique, *Connell Vet.* No. 52, pp. 280-284.
 43. Messier, S., Higgins R., Coulura J., and Morin R., 1984. -- Comparison of Studying the Flora of the Bovine Uterus, *Can. - Vet.* 2, 25:283-286.
 44. Miller R. B., 1977, A Summary of some the pathogenetic mechanisms involved in bovine abortion, *Can. Vet. Jour.*, Vol. 18-No. 4, April, pp. 87-95.
 45. Morrow David A., 1980, *Current Therapy in Theriogenology: -- Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animal W. B.*, Saunders Company, pp. 213-222.

46. Nsoussa A. et Fedida H., 1914. Les avortements infectieux non-brucelliques des bovins, Rôle des Virus, Bull. Soc. Sci. Vet. et Méd. Comparée Lyon, Vol. 81, No. 2, pp. 117-120.
47. Mylrea, P. J., 1912. The Diagnosis of Brucellosis in Dairy -- Herts. Australian Veterinary Journal, Vol. 48, July, pp. 369-375.
48. Ole, H. V. S., Bartlett, D. E., Carkrey, C. H., Knutson, W. H. Langford, E. V., and Seigfried., 1919. Recommended Procedures for Microbiologic Examination of Semen, The American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Madison, Wisconsin. pp. 10.
49. Osburn, B. I., MacLachlan, N. J., and Andersen C. R., 1983.- A review of Bovine bluetongue, The Bovine Proceedings, No. 19 April, pp. 23-28.
50. Parsonson, I. R., Della-Porta, A. J., and Snowden W. A., --- 1980, Developmental Disorders of the Fetus in some Anthropod Borne virus infections Am. J Trop. Med. Hyg. 30 (3), pp. 660- - 673.
51. Quiroz R. H., 1983., Enfermedades parasitarias que causan -- abortos, IX Congreso Nacional de Buiatria, Puebla, pp. 200--208.
52. Reed, D. E., Bicknell, E. J., Landon, C. A., Knutson, W. H. and Kirkbride, C. A., 1971. Infectious Bovine Rhinotracheitis virus induced abortion, Rapid diagnosis by fluorescent antibody technique. Am. J. Vet. Res. 32:1423-1426.
53. Reed, D. E., Lincoln, S. D., Kaupian, R. P., Chow, T. L. and Whiteman, C. E., 1975. Comparison of Antigenic Structure and Pathogenicity of Bovine intestinal Chlamydia isolate with an Agent of epizootic Bovine abortion, Am. J. Vet. Res., Vol. - 36, Agust pp. 1141-1143.

54. Robert Charles S., 1975. Leptospirosis-Induced abortion, Laboratory Diagnosis of Bovine Abortion, Edited by Clyde A. Kirkbride, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp. 20-33.
55. Rosiles, M. R., Cromatografía en capa fina y lectura frente al estándar de Aflatoxina B₁, Zearalenona y Nicotina T₂ con luz U. V., Comunicación personal al Dr. Pablo Correa Gialón, - 1985.
56. Rowe, F. R., and Smithies, L. K., Causes of abortion in Dairy Cattle: A Diagnostic Survey, Clinical Report, Central Laboratory, 6101, Mineral point Road Madison, Wisconsin, 53705, pp. 102-103.
57. Schultz, R. D., and Scheffly, B. E., Current status of viral infections of Bovine Genital Tract., Auburn University, Auburn Alabama, pp. 503-509.
58. Snedecor, W. G., and Cochran, G. G., 1967, Statistical Method 6a. Edition, Iowa State University Press, Ames Iowa, U.S.A., pp. 57-61 y 11-119.
59. Smart, A. Ross., 1975, Brucellosis spp-Induced Abortion, Laboratory Diagnosis of Bovine Abortion, Edited by Clyde A. Kirkbride, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp. 12-17.
60. Smith E. Russell., 1975, Corynebacterium avium-Induced abortion, Laboratory Diagnosis of Bovine Abortion, Edited by Clyde A. Kirkbride, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp. 17-20.
61. Smith E. Russell., 1975, Listeria monocytogenes-Induced abortion, Laboratory Diagnosis of Bovine Abortion, Edited by Clyde A. Kirkbride, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp. 12-17.

62. Spensley P. C., 1960. Tropical Products Institute. Comunica-
ción personal al Dr. P. Correa Gialón, Sep.
63. Storz, C., and Whitteman., 1931. Bovine Chlamydial Abortions,-
The Bovine Practitioner, No. 16 November, pp. 71-73.
64. Stuart, R. D., 1946. The preparation and use of a simple cul-
ture medium for Leptospirosis. J. Duct. & Path. 28:343-347.
65. Staker, G., Ehrensperger, F., Pohlenz, J., und Troll, C., ---
1977. Zur Bedeutung und Diagnostik des Pilzabortes des Rindes
Zbl. Vet. Med. B., 26, pp. 164-176.
66. Talavera, J. C., De la fuente, G., y Benavides, L. A., 1973,-
Pérdidas económicas por problemas reproductivos. Técnica Pe-
cuaria en México, No. 27, pp. 21-32.
67. Tizard Ian R., 1977. Immunología Veterinaria, Nueva editorial
Interamericana S.A. de C.V., pp. 126-173.
68. Whittemore Howard I., 1963. Specific Infectious Diseases That-
Limit Bovine Reproduction, The Bovine Proceeding, No. 19, Ap-
ril, pp. 46-60.
69. Whittemore H. L., Olson, J., and Zemjanis, R., Intrauterine in-
fusion of bovine-diarrhea virus at the time of natural breed-
ing and intramuscular inoculation during early pregnancy, X -
Congreso Mundial de Zootecnia, México, Agosto 16-18, 1976, pp.
174.