



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**PERFIL SEROLÓGICO  
PARA LOS PRINCIPALES AGENTES INFECCIOSOS ASOCIADOS CON  
PROBLEMAS REPRODUCTIVOS  
EN BOVINOS DE LECHE EN DIFERENTES ESTADOS  
DE LA REPÚBLICA MEXICANA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :**

**GABRIELA ZENTENO RAMÍREZ**

ASESOR:

**DR. JOSE FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ**



Universidad Nacional  
Autónoma 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 esta 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.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de Tesis se la dedico con mucho cariño a mis padres Gerardo y Dolores y a mis hermanos Eduardo y Erika, por todo el tiempo que me han cuidado y apoyado, ya que es el fruto de muchos días de desvelo conmigo que de la manera mas humilde retribuyo.

También se la dedico a una persona muy especial, que desde que lo conocí se ha dedicado a formarme como MVZ y me ha abierto las puertas para seguir creciendo. Con Mucho Cariño para usted Dr. J. Francisco Morales Álvarez.

Carlos Oropeza, aunque se que estas en el cielo, este trabajo te lo dedico con mucho cariño ya que muchas veces compartimos el sueño de grandeza y nada ni nadie nos detenía.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al a Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C4 por ser mi segunda casa y hacer de mi una universitaria orgullosa de pertenecer a la UNAM.

Al CENID-Microbiología INIFAP que brindó sus Instalaciones en el Laboratorio de Diagnóstico para que pudiera realizar tanto mi Servicio Social como mi trabajo de Tesis.

Al Director del INIFAP Dr. Ricardo Flores Castro por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

Agradecimiento al CONACyT por la beca otorgada del proyecto “Estudio comparativo de la eficacia de la cepa RB51 y cepa 19 para prevenir la Brucelosis en hatos con diferentes condiciones sanitarias” (SAGARPA-2004-C01-23/A-1).

A mis sinodales que apoyaron de manera muy activa en la revisión de la Tesis.

Agradezco a todos mis profesores por transmitir todos los conocimientos que poseen.

A la Dra. Irene Vitela y a su grupo de alumnos y alumnas que apoyaron este trabajo, brindando su tiempo para cada uno de los muestreos y ser una excelente anfitriona en el Estado de Aguascalientes.

A la Dra. Lucy por conseguirmos los ranchos, colaborar en el muestreo y ser una muy buena amiga.

A Dr. David Martínez de la Universidad Autónoma de Veracruz, que nos mando muestras del Estado de Veracruz.

Al Dr. Jaime López por colaborar en el muestreo de Celaya.

A todos los dueños de los ranchos lecheros involucrados, por permitirnos tomar muestras de sus vacas.

Agradezco de manera muy especial a mis amigos que han vivido muchas cosas a mi lado y siempre me alentaron a seguir adelante en momentos difíciles: Elena, Jesús, Paty, Karina, Delman, Dey, Lupita, Vicky, José, César y Moisés.

Papa:

Gracias, pero mil gracias por apoyarme en todas mis decisiones.

Madre:

Aunque no siempre compartimos ideas, estoy totalmente de acuerdo contigo y con Dios de que seas mi mami. Te Quiero Mucho.

Ery:

Te agradezco tantos años que me has tomado de la mano y visto por mí en todo momento.

Eduardo:

Te doy las gracias por que de una u otra forma siempre me has cuidado.

Paco:

No existe acción humana que pueda demostrar cuanto te agradezco el infinito apoyo que siempre me has brindado, que de la manera más desinteresada y humilde me has formado, pero sobre todo por ser mi amigo.

## ÍNDICE

<b>I.- RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>III.- JUSTIFICACIÓN</b>	<b>9</b>
<b>IV.- OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>V.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
▪ <b>5.1 Planteamiento.</b>	<b>11</b>
▪ <b>5.2 Muestras.</b>	<b>12</b>
▪ <b>5.3 Técnicas de diagnóstico.</b>	<b>14</b>
• <b>5.3.1 Pruebas serológicas.</b>	<b>14</b>
• <b>5.3.2 Pruebas diagnósticas no serológicas.</b>	<b>18</b>
▪ <b>5.4 Análisis estadístico.</b>	<b>19</b>
<b>VI.- RESULTADOS</b>	<b>21</b>
<b>VII.- DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>VIII.- CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>IX.- LITERATURA CITADA</b>	<b>42</b>

## I.- RESUMEN

El presente trabajo se realizó en tres etapas: la primera tuvo como propósito conocer la seroprevalencia de las principales enfermedades que causan aborto en ganado lechero ubicado en diferentes estados de la República Mexicana. Se obtuvieron muestras de suero de 8123 vacas para un proyecto de investigación sobre Brucelosis desarrollado en el CENID-Microbiología INIFAP. Los establos se ubican en los estados de Veracruz (5), Guanajuato (43), Querétaro (1), Aguascalientes (9) y Estado de México (1). Las enfermedades incluidas en el estudio fueron: Brucelosis, Neosporosis, Diarrea Viral Bovina (DBV), Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) y Leptospirosis. El 100 % de las muestras fueron procesadas para Brucelosis y para las demás enfermedades sólo se procesó el 10% de los sueros. La seroprevalencia de brucelosis fue alta en todos los Estados (17%-21%) excepto en Veracruz (3%); un comportamiento similar se observó en leptospirosis donde la seroprevalencia más alta correspondió al Estado de Aguascalientes (27%) y la más baja para Veracruz (3%). En el caso de DVB e IBR las seroprevalencias más altas se observaron en Aguascalientes (88% y 77%) y Querétaro (86% y 85%) y relativamente bajas en Veracruz (47% y 38% respectivamente). En cuanto a neosporosis la seroprevalencia en Veracruz fue del 15% y en los demás estados osciló entre el 30% y 45%. En la segunda etapa se realizó un estudio de caso con 13 abortos obtenidos en un establo de Aguascalientes; a partir del líquido abomasal, se logró el aislamiento e identificación *Brucella abortus* en solo 6 casos por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo que da importancia a que en el estudio de abortos, se deba establecer el diagnóstico etiológico, ya que es frecuente implicar sólo a la brucelosis, dejando a un lado la participación de otros agentes. Por tal motivo se llevó a cabo una tercera etapa, la cual consistió en un estudio serológico comparativo integral realizado en grupos de vacas con y sin antecedentes de aborto en 6 unidades productivas en el mismo estado y 2 del Estado de México. Los resultados fueron variables sobre el origen de los abortos; por ejemplo en el rancho uno de un total de 20 vacas abortadas, 14 resultaron ser positivas a DVB y de las no abortadas 8/20 fueron positivas, encontrando diferencia significativa entre los dos grupos ( $p < 0.05$ ); en cuanto al nivel de anticuerpos, éstos se encontraron más altos en las abortadas que en las no abortadas, sin encontrar una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Es evidente la

seroprevalencia alta encontrada en DVB e IBR debido a los programas intensivos de vacunación que pueden explicar estos resultados. Actualmente la Leptospirosis y la Neosporosis, han tenido un impacto importante como causales de aborto en bovinos, lo cual se confirma con las prevalencias altas encontradas. En el caso de neosporosis a diferencia de las enfermedades antes mencionadas, no existe un programa de vacunación específico en los establos bajo estudio, por lo que es una de las enfermedades que deben considerarse de alto impacto en las unidades productivas como causante de aborto. Por otro lado, a pesar de las intensas campañas dirigidas contra la brucelosis y contar con excelentes vacunas (Cepa 19 y la RB51) sigue siendo una enfermedad con alta prevalencia en establos lecheros.



## II.- INTRODUCCIÓN

El sistema de producción animal que tiene mayor impacto en la economía nacional es sin lugar a dudas, el ganado bovino, no sólo por la cantidad de recursos económicos y humanos relacionados en él, sino fundamentalmente debido a la cantidad de alimentos que se obtienen a partir de esta especie. A pesar de contar con una cantidad aproximada de treinta millones de cabezas de ganado bovino, la producción que se obtiene es insuficiente para satisfacer la demanda nacional.<sup>6</sup> La finalidad de las unidades productoras de leche es cubrir la mayor parte de esa demanda y para que una unidad sea productiva necesita producir leche de calidad, terneros y como subproducto, carne.<sup>15</sup>

Las enfermedades infecciosas, ya sean de origen viral, bacteriano, micótico o parasitario, tienen gran importancia en las unidades de producción animal, por las severas pérdidas que causan. En algunas ocasiones estas enfermedades pueden afectar a muchos animales en un lapso breve, llegando a alcanzar índices altos de mortalidad.<sup>9</sup>

Las enfermedades de la reproducción del ganado, provocan incrementos en los gastos por concepto de medicamentos, pérdida de la cría, disminución de la producción de leche y como consecuencia desecho del animal, lo cual se refleja en pérdidas económicas severas en la explotación, provocando que los costos excedan los beneficios.<sup>15,19</sup>

En investigaciones recientes, en el Estado de Aguascalientes, se ha determinado que el 34.0% de desecho de ganado bovino productor de leche se debe a problemas del sistema urogenital. Este valor es menor al registrado por otros investigadores en México, quienes reportan datos que van del 59.0% al 62.0%, considerando al aborto como una de las causas más importantes de desecho (11.2 %).<sup>41</sup>

Entre las enfermedades infecciosas de los bovinos cuya manifestación más aparente es el aborto se encuentran: brucelosis, leptospirosis, diarrea viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina y neosporosis, entre otras.<sup>19</sup>

La brucelosis, también conocida como enfermedad de Bang, está clasificada como una enfermedad infecto-contagiosa de origen bacteriano ocasionada por *Brucella abortus*. Es un microorganismo intracelular facultativo capaz de sobrevivir y multiplicarse en el interior de los fagocitos del hospedador, siendo la placenta uno de los lugares más idóneos para su replicación.<sup>11</sup> Afecta a diferentes especies de animales domésticos y de vida salvaje, así como al humano (Fiebre de Malta), por lo que se considera una zoonosis.<sup>18, 27, 29</sup>

En la brucelosis los hallazgos clínicos dependen del estado inmunitario del hato. En vacas susceptibles preñadas y no vacunadas, la manifestación más característica es el aborto en el último tercio de la gestación. Las secuelas más comunes a los abortos son retención de la placenta y la metritis.<sup>11</sup> Las vacas infectadas o que han abortado liberan gran cantidad de bacterias al medio ambiente hasta por 15 días posteriores al aborto, con las que se contamina el agua y el alimento con los cuales se podrían infectar otras vacas. Las hembras infectadas diseminan la bacteria en la leche de manera continua.<sup>6,27</sup> Por otro lado, se ha demostrado que una vaca infectada elimina la bacteria al parto en gestaciones subsecuentes, siendo un factor de riesgo que promueve la alta incidencia en las poblaciones animales y en el humano.<sup>10</sup>

Las pruebas empleadas para el diagnóstico de la brucelosis incluyen el aislamiento e identificación por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y pruebas serológicas, para detectar la presencia de anticuerpos en sangre, leche, suero lácteo y moco vaginal; las pruebas serológicas que se pueden emplear son: prueba de aglutinación en suero, prueba de rosa de Bengala, Fijación del complemento, Inmunoanálisis enzimático (ELISA), Inmudifusión radial utilizando como antígeno el hapteno nativo y para detectar la presencia de anticuerpos en leche se emplea la técnica de Anillo en leche.<sup>29,1</sup>

La manera de prevenir su entrada y diseminación en un rancho es evitar la introducción de animales positivos o infectados, detectar y reducir los reservorios de infección y aplicar medidas cuarentenarias. Para el control y erradicación de la enfermedad es necesaria la eliminación de animales infectados, la vacunación específica y la aplicación de medidas sanitarias.<sup>29</sup>

En general es una enfermedad que causa graves pérdidas económicas al productor, ya que es una enfermedad cuyo tratamiento es ineficaz y costoso; retrasa el avance genético de la explotación; infecta a animales de todas las edades, siendo más notorio en hembras gestantes, manifestándose como aborto en el último tercio de la gestación, baja en la producción láctea, infertilidad y esterilidad.<sup>31</sup> Se ha determinado en estudios económicos que el costo estimado de un producto abortado de bovino, incluyendo costos directos e indirectos, oscila entre \$ 10,000.00 y \$ 12,000.00.<sup>34</sup>

Los pestivirus de los rumiantes y en particular el que causa la DVB, consta de dos biotipos denominados citopático y no citopático, según los efectos que ejercen sobre los cultivos celulares. El tipo no citopático es el más frecuente e importante. Es el único que atraviesa la placenta e invade al feto, provocando en él una infección persistente que es crucial para la diseminación del virus, ya que los animales infectados son seronegativos durante los primeros meses de vida. Los virus no citopáticos desencadenan una amplia gama de trastornos congénitos, intestinales, de la reproducción y en general disminuyen las defensas contra otras enfermedades. Además, este virus puede infectar a ovinos y otros rumiantes salvajes como venados y bisontes.<sup>6,29,30</sup>

El virus se transmite mediante el contacto directo entre los animales y por el contagio materno-fetal transplacentario, además de las secreciones (nasal, la saliva, el semen, las heces, la orina, las lágrimas y la leche) e incluso los fetos abortados procedentes de una vaca infectada constituyen la fuente principal del virus. Un medio de transmisión eficaz entre los animales con infección persistente y los vulnerables es el contacto internasal. De este modo, los animales con infección persistente pueden introducir la enfermedad en un hato o transmitirla a las vacas vulnerables durante el apareamiento. Los fomites pueden jugar un papel importante en la transmisión mediante la palpación rectal con el mismo guante de vaca a vaca. Los animales sensibles también podrían adquirir la infección al reutilizar una aguja hipodérmica o unas tenazas nasales.<sup>29</sup>

Las pérdidas económicas causadas por la introducción del virus que causa la DVB en un establo vulnerable donde existen vacas preñadas, se deben a los abortos, las anomalías congénitas, los mortinatos, la elevada mortalidad neonatal, el retraso del

crecimiento pre y posnatal, la caída del rendimiento productor y la eliminación precoz de los animales con infección persistente.<sup>29</sup>

La rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) conocida también como “nariz roja”. Es una enfermedad específica de los bovinos, causada por el herpesvirus tipo I. Afectando las vías respiratorias superiores y la tráquea; en el ganado vacuno la infección puede adoptar diversas formas, que incluyen la respiratoria, la conjuntival, la vulvovaginitis pustulosa infecciosa que afecta al tracto reproductor caudal, los abortos endémicos y la forma sistémica de los neonatos que se caracteriza por encefalitis y necrosis focal en placas de la lengua.<sup>6,30</sup>

Los animales afectados manifiestan signos durante un periodo de 7 a 14 días y después de ese tiempo curan, a no ser que exista una infección secundaria. Durante la infección aguda o en las 4 a 8 semanas siguientes puede haber abortos. Aunque puede existir la mortalidad de los fetos en cualquier fase de la gestación, la mayoría de los abortos aparecen en el segundo o en el tercer trimestre de preñez. La infección fetal directa, el estrés y la fiebre elevada pueden coadyuvar en los abortos.<sup>6,30</sup>

Las técnicas comunes para el diagnóstico de IBR son: seroneutralización, fijación del complemento, ELISA, neutralización viral, aislamiento viral, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.<sup>3</sup>

Desde un enfoque económico, la importancia de la IBR aún no ha sido evaluada completamente, pero se calcula que en diez años se remueve 18% del hato por enfermedades infecciosas, de las cuales es relevante el aborto.<sup>30</sup>

Desde 1988 se detectó la presencia de *Neospora caninum* en perros en Estados Unidos de América y posteriormente se demostró que este parásito tiene un amplio rango de hospedadores, entre éstos se encuentran animales domésticos como bovinos, felinos, caninos, ovinos, equinos y animales silvestres, como coyotes, zorros y lobos. Con base en estudios seroepidemiológicos, se ha informado en diversas partes del mundo que la neosporosis en el ganado, tanto productor de leche como productor de carne, causa alteraciones reproductivas provocando fuertes pérdidas económicas. En Inglaterra, Irlanda,

Escocia, Alemania, Holanda, Suiza, Suecia y España ha sido reportado *Neospora caninum* asociado con el aborto en bovinos.<sup>33</sup>

En México la neosporosis fue detectada en 1997, en un feto abortado de la raza Holstein, macho, de cinco meses de gestación, que presentó lesiones histológicas características, confirmándose la presencia del parásito a través de inmunohistoquímica. Existen estudios serológicos realizados en México donde se encontraron altas seroprevalencias, por lo que se consideró que la enfermedad podría estar ampliamente difundida en los principales hatos lecheros mexicanos, por ejemplo; de 185 animales que fueron muestreados en cuatro municipios de Coahuila, 84 resultaron positivos, obteniéndose una frecuencia para el estado de 45 %. La frecuencia encontrada en Nuevo León fue de 40 % y en Tamaulipas fue de 16 %.<sup>33</sup>

Los abortos causados por *Neospora caninum* pueden presentarse de manera esporádica, en forma masiva o ser comunes y afectar de manera continua al ganado de una explotación.<sup>7</sup> Con mayor frecuencia producen aborto en el primero y segundo tercio de la gestación.<sup>5</sup> En el primer periodo de gestación es donde comúnmente se observan las mayores consecuencias.<sup>14</sup> En México, no existen datos sobre el impacto de esta enfermedad en términos económicos y productivos. Las pérdidas económicas registradas en países como Suiza, EE.UU. y Australia están alrededor de 5, 35 y 85 millones de dólares por año, respectivamente.<sup>28</sup>

La leptospirosis bovina es causada por *Leptospira interrogans* se encuentra distribuida prácticamente en todo el territorio nacional, teniendo una gran diversidad de serovariedades, sin que se conozca exactamente cómo están distribuidas.<sup>36</sup> En un estudio realizado en el Estado de Yucatán se encontró que el 62% de 734 sueros resultaron positivos a más de una serovariedad utilizando la prueba de microaglutinación y de las serovariedades más comunes se encontró a *L. hardjo* (54.1%) y *L. tarassovi* (53.3%).<sup>37</sup> Otro estudio publicado, en el cual se trabajó con 4043 muestras de suero bovino de distintas regiones del país, informó una mayor seroprevalencia de las serovariedades *hardjo*, *wolffi* y *tarassovi* en un 31.1% y en el año de 1994 la prevalencia obtenida de otros trabajos similares se encontró en un 34%.<sup>20</sup>

El impacto producido por la leptospirosis se debe a que ocasiona trastornos reproductivos, entre los que destacan la muerte embrionaria, aborto, nacimiento de crías débiles y la disminución de la producción de leche en cada una de sus presentaciones (aguda, subaguda y crónica).<sup>27</sup>

El aborto además de ocasionar la pérdida directa de la cría, provoca que el periodo de los días abiertos y el intervalo entre partos se prolonguen demasiado y como consecuencia la pérdida de la vaca.<sup>9</sup> También, es la causa de otras tantas pérdidas que no son estimadas por el productor, pues aumenta la inversión por concepto de alimentación, mano de obra para el manejo del ganado, medicamentos, instalaciones, agua, etc., y por lo tanto el capital invertido tarda más en recuperarse.<sup>15</sup>

### III.- JUSTIFICACIÓN

Los trastornos reproductivos caracterizados por repetición de calores, infertilidad, abortos, mortinatos, momias y otros signos de este origen en ganado bovino, causan grandes pérdidas económicas a la ganadería nacional. Actualmente, en México se cuenta con información referente a la incidencia y prevalencia de la mayoría de los agentes etiológicos que se involucran en estos trastornos en el ganado bovino productor de leche, como es el caso de brucelosis, leptospirosis, rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea viral bovina y neosporosis, sin embargo los estudios realizados en este tema se han hecho de manera aislada y en muy pocos casos se analizan de manera integral. De aquí parte la importancia de aportar más datos, sobre la seroprevalencia de las enfermedades reproductivas analizadas de manera integral.

El impacto de estas enfermedades no solo se ve reflejado en términos económico-productivos, sino que el humano puede ser afectado directamente, por ejemplo la brucelosis y la leptospirosis son consideradas las principales zoonosis de origen bacteriano, no solo en México, sino a nivel mundial.<sup>21</sup> Por otro lado, el impacto que se puede ver directamente en el ganado es la pérdida de la vaca y su producto, que podría ser causado por cualesquiera de estas enfermedades; por ejemplo *Neospora caninum* es un microorganismo ampliamente distribuido a nivel mundial, sin embargo, en México existen pocos estudios en el ganado bovino por lo que se desconoce su incidencia y prevalencia.<sup>19</sup> La rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) afecta a los bovinos de cualquier edad, causando problemas reproductivos, estando involucrado en un 15.5% de los abortos, sobre todo en el último tercio de la gestación.<sup>38</sup>

El contar con una estrategia diagnóstica para las enfermedades que tienen un impacto sobre la reproducción, puede ser la base para el diseño de programas de manejo integral en ganado de leche, con énfasis en el diagnóstico, prevención y control de estas enfermedades y por lo tanto disminuir pérdidas productivas y económicas.

## **IV.- OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el perfil serológico contra distintos agentes etiológicos de carácter infeccioso que afectan la fertilidad de bovinos de leche, mantenidos en distintos Estados de la República Mexicana, con el fin de conocer su seroprevalencia, establecer una estrategia diagnóstica, realizar un análisis integral y poder dirigirse hacia un diagnóstico más preciso.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la presencia de anticuerpos contra los diferentes agentes infecciosos que producen afecciones reproductivas: virus de la diarrea viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina; así como de los agentes bacterianos, *Leptospira spp*, *Brucella abortus*, y el parásito *Neospora caninum*.
- Realizar un estudio de caso encaminado al diagnóstico etiológico de la brucelosis.
- Analizar de manera comparativa el perfil serológico de los agentes infecciosos: diarrea viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina; así como de los agentes bacterianos, *Leptospira spp*, *Brucella abortus*, y el parásito *Neospora caninum*, en grupos de vacas abortadas y no abortadas, para tratar de establecer un diagnóstico integral.



## **V.- MATERIAL Y MÉTODOS**

Esta investigación se realizó en las Instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el Km. 15.5 de la Carretera México–Toluca en la Delegación Cuajimalpa, D.F.

### **5.1 Planteamiento**

El presente trabajo se organizó en tres etapas las cuales se describen a continuación:

#### **Etapas I:** Determinación de Seroprevalencias.

En esta etapa se determinó la seroprevalencia de las principales enfermedades responsables de producir aborto; tomando muestras de bovinos productores de leche, ubicados en diferentes estados de la República Mexicana.

#### **Etapas II:** Estudio de caso.

En un establo lechero ubicado en el estado de Aguascalientes, se levó a cabo el estudio de caso encaminado al diagnóstico definitivo de la brucelosis a partir de líquido abomasal y contando además con muestras de suero de vacas que habían abortado y tejidos fetales.

#### **Etapas III:** Análisis serológico comparativo en diferentes grupos de vacas.

Esta tercera etapa consistió en seleccionar grupos de vacas con y sin antecedente de aborto en ranchos ubicados en el estado de Aguascalientes. Así mismo, en el Estado de México (Ixtlahuaca) se seleccionaron tres grupos de vacas: con antecedente de aborto, sin antecedente de aborto y repetidoras.

## **5.2 Muestras.**

Se tomaron muestras sanguíneas de bovinos lecheros en cinco estados de la República Mexicana. En cada estado se contó con la participación de unidades de producción cooperantes. En el estado de Veracruz (Municipio de Las Choapas), colaboraron 5 ranchos donde se obtuvieron un total de 1367 muestras de suero; el Estado de Aguascalientes con 9 ranchos y 1820 vacas; Guanajuato con 43 unidades de producción en la cuenca lechera de “Merino”, municipio de Juventino Rosas con un total de 2620 animales; en Querétaro (municipio el Marqués) sólo se contó con una unidad de 2114 animales y por último el Estado de México con 202 vacas en un establo en el municipio de Jilotepec.

En los estados de Veracruz y Querétaro el trabajo de muestreo fue llevado a cabo por los coordinadores regionales del proyecto al que pertenece esta tesis y posteriormente fueron remitidos al CENID-Microbiología Animal. En los demás estados se participó de manera activa en la toma de las muestras.

El número total de muestras colectadas fue de 8123.

### **Etapa I: Determinación de Seroprevalencias.**

El 100% de los sueros (8123) se sometieron a las pruebas serológicas para brucelosis, establecidas en la NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.<sup>32</sup> Sólo con el 10% de las muestras (800 sueros), se determinó mediante serología, la seroprevalencia de DVB, IBR, *Neospora* y *Leptospira* que son enfermedades que producen aborto en bovinos.

### **Etapa II: Estudio de caso.**

De un establo lechero ubicado en San Francisco de los Romos, Aguascalientes, México, se obtuvieron muestras de tejidos en formalina al 10 % y líquido abomasal en

refrigeración de 13 fetos abortados. En este mismo rancho fueron colectadas muestras de suero de 55 vacas con historial de aborto.

**Etapa III: Análisis serológico comparativo en diferentes grupos de vacas.**

Se conformaron grupos de vacas con historial de aborto y vacas que no habían abortado de un mismo rancho y en un periodo determinado (2 a 3 meses antes de la toma de la muestra). Se trabajó con 6 ranchos de Aguascalientes, ubicados en diferentes municipios. Los parámetros a evaluar fueron: la seroprevalencia de las principales enfermedades causales de aborto (brucelosis, DVB, IBR, neosporosis y leptospirosis), así como los niveles de anticuerpos para que se analizaran de forma comparativa entre los dos grupos. En el Cuadro 1, se muestra el número de animales por rancho y por grupo.

**Cuadro 1. Relación de los ranchos y numero de vacas con y sin antecedente de aborto.**

	<b>Rancho 1</b>	<b>Rancho 2</b>	<b>Rancho 3</b>	<b>Rancho 4</b>	<b>Rancho 5</b>	<b>Rancho 6</b>
<b>ABORTADAS</b>	20 vacas	21 vacas	9 vacas	21 vacas	4 vacas	8 vacas
<b>NO ABORTADAS</b>	19 vacas	26 vacas	9 vacas	20 vacas	7 vacas	9 vacas
<b>TOTAL</b>	<b>39</b>	<b>47</b>	<b>18</b>	<b>41</b>	<b>11</b>	<b>17</b>

Por otro lado, se lograron colectar sueros de vacas abortadas, repetidoras, vaquillas abortadas, vacas paridas y vaquillas gestantes de 2 unidades de producción lechera ubicadas en el Municipio de Ixtlahuaca, Estado de México. Las muestras de estos animales también fueron analizadas de manera comparativa. En una de las unidades se procesaron 24 muestras serológicas y en la otra unidad 15 sueros (5 de abortadas, 5 de no abortadas y 5 paridas).

### **5.3 Técnicas de diagnóstico.**

Las técnicas de diagnóstico empleadas para cada estudio se describen a continuación:

#### **5.3.1 Pruebas serológicas,**

##### **Brucelosis.**

Las técnicas empleadas son las establecidas en la NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, donde primero se les corrió la prueba tamiz de Rosa de Bengala al 8% y sólo a los positivos, se les realizó la prueba de Rivanol, considerándose positivos a los que presentaron una aglutinación completa en cualquiera de las diluciones de 1/50 hasta 1/400.<sup>32</sup>

##### **Diarrea Viral Bovina.**

Para la diarrea viral bovina se realizaron pruebas de ELISA indirecta empleando un “Kit” comercial.\* Es un inmunoensayo enzimático indirecto que detecta anticuerpos específicos contra DVB en muestras de suero. Se utilizan placas de microtitulación tapizadas con antígeno de DVB. Los anticuerpos frente a DVB presentes en la muestra se unen al antígeno de la placa. El material no ligado se elimina mediante un lavado de la placa. El complejo antígeno-anticuerpo se detecta mediante un conjugado peroxidasa de rábano, el resto de conjugado se elimina mediante el lavado de la placa y se añade una solución de sustrato/cromógeno. En presencia de la enzima, el sustrato se convierte en un producto que reacciona con el cromógeno generando una coloración azul. Al añadir la solución de frenado, se genera un color amarillo. La absorbancia se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda única de 450 nm. Con las lecturas obtenidas se puede calcular el valor denominado cociente M/P, el cual se utiliza para determinar cuándo una muestra es positiva o negativa; es el resultado que se obtiene considerando los valores de absorbancia promedio de los controles positivos y negativos. El desarrollo de color indica la presencia de anticuerpos frente a DVB en la muestra.

---

\* IDEXX Laboratories.

La fórmula diseñada para cálculo del resultado de la muestra analizada es la siguiente:

$$\text{M/P} = \frac{\text{Muestra} - \text{CN} \bar{X}}{\text{CPx} - \text{CN} \bar{X}}$$

Donde:

**Muestra:** La densidad óptica registrada por el lector de ELISA

**CN $\bar{X}$ :** Media de los controles negativos.

**CP $\bar{X}$ :** Media de los controles positivos.

#### **Interpretación de resultados.\***

- ✓ Las muestras con valores de M/P menores de 0.2 son consideradas como negativas para anticuerpos de DVB.
- ✓ Las muestras con valores de M/P mayores de 0.2 pero menores a 0.3 son consideradas como dudosas.
- ✓ Las muestras con valores de M/P mayores o iguales a 0.3 son consideradas positivas.

#### **Rinotraqueitis Infecciosa Bovina.**

Se corrieron pruebas de ELISA competitiva para determinar el título de anticuerpos de rinotraqueitis infecciosa bovina utilizando “Kits” comerciales.\* Es un ensayo inmunoenzimático para detectar la presencia de anticuerpos contra la glicoproteína B (gB) del BHV-1 en suero. Tras la incubación del suero problema en el pozo tapizado con antígenos, el anticuerpo específico contra IBR forma un complejo con los antígenos virales inmovilizados. Después de eliminar mediante lavado los materiales no unidos, se añade el conjugado de anticuerpos monoclonales específico gB, que no se unirá al antígeno de BHV-1 cuando el determinante antigénico haya sido bloqueado anteriormente por anticuerpos de la muestra a analizar. Posteriormente se añade una solución de substrato/cromógeno. En presencia de la enzima, el substrato se convierte en un producto que reacciona con el cromógeno, generando una coloración azul. Con la adición de la

---

\* IDEXX Laboratories.

solución de frenado se genera un color amarillo. La absorbancia se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda única de 450 nm. El porcentaje de bloqueo de las muestras se calcula usando la absorbancia obtenida con la muestra analizada y un suero negativo que contiene anticuerpos no específicos (suero de control negativo).

La fórmula para cálculo del porcentaje de bloqueo:

$$\frac{CN\bar{x} - DO \text{ muestra}}{CN\bar{x}} \times 100$$

$$CN\bar{x}$$

Donde:

**CN $\bar{x}$** : Media de los controles negativos.

**DO**: Densidad Óptica de la muestra.

#### **Interpretación de resultados.\***

- ✓ Las muestras con un porcentaje de bloqueo inferior al 45% se clasifican como negativas para anticuerpos de IBR.
- ✓ Las muestras con un porcentaje de bloqueo superior o igual al 45%, pero inferior al 55%, se consideran sospechosas y deben analizarse de nuevo.
- ✓ Las muestras con un porcentaje de bloqueo del 55% y valores superiores se consideran positivos en anticuerpos de IBR.

#### **Neosporosis.**

Para la detección de anticuerpos tipo IgG anti-*Neospora* se utilizó la prueba de ELISA indirecta, empleando un “kit” comercial\*, que se basa en un inmunoanálisis enzimático que detecta anticuerpos contra neospora en suero bovino mediante un procedimiento similar a DVB.

$$M/P = \frac{\text{Muestra} - CN\bar{x}}{CN\bar{x}}$$

---

\* IDEXX Laboratories.

## CP<sub>x</sub> - CN<sub>x̄</sub>

Donde:

**Muestra:** La densidad óptica registrada por el lector de ELISA

**CN<sub>x̄</sub>:** Media de los controles negativos.

**CP<sub>x̄</sub>:** Media de los controles positivos.

### **Interpretación de resultados.\***

- ✓ Las muestras de suero con cocientes M/P menores que 0.50 se clasifican como negativas hacia los anticuerpos contra *Neospora*.
- ✓ Si en cociente M/P es mayor o igual que 0.50, las muestras se clasifican como positivas hacia los anticuerpos contra *Neospora*.

Nota: En la interpretación de resultados obtenidos para DVB, IBR y *Neospora*.

Considerando que:

- Los “Kits” de diagnóstico utilizados para las diferentes enfermedades establecen puntos de corte comerciales (P.C.C) mediante índices M/P o porcentaje de bloqueo, según sea el caso.
- Que con estos valores se puede determinar la presencia de animales negativos, sospechosos y positivos.
- Que los animales con valores bajos se consideran negativos y aquellos con valores altos son considerados positivos.
- Que estos valores de alguna manera están relacionados con la presencia de anticuerpos específicos para los agentes evaluados.

Entonces, se infiere que los valores de M/P y en su caso porcentaje de bloqueo, en cada prueba, son directamente proporcionales a los niveles de anticuerpos presentes en los animales bajo estudio.

### **Leptospirosis.**

Para la detección de la presencia de algunas serovariedades de *Leptospira* se corrieron pruebas de microaglutinación. Fueron considerados positivos aquellos animales con títulos iguales o mayores a 1:100 a cualesquiera de las serovariedades analizadas (*wolffi*, *hardjo*, *tarassovi*, cepa Palo Alto (P.A) y H89).

### **5.3.2 Pruebas diagnósticas no serológicas para el estudio de caso.**

#### **Histopatología.**

El análisis histopatológico se realizó a partir de las muestras fijadas con formalina amortiguada al 10% y procesadas con la técnica usual de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina.

#### **Aislamiento.**

Las muestras de líquido abomasal fueron cultivadas en medio enriquecido de Farell. Los aislados con características morfológicas correspondientes al género *Brucella* se les dio seguimiento para su identificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### **Identificación de *Brucella* mediante PCR.**

Los aislados sugerentes de ser *Brucella*, fueron identificados mediante la técnica de PCR. La prueba de PCR utiliza dos pares de iniciadores que permiten la identificación de cepas de campo de *Brucella abortus* y su diferenciación entre las cepas vacunales (S-19 y RB-51) (Cuadro 2)<sup>35,40</sup>. Los fragmentos que se amplifican, dependiendo de la cepa son de 361, 456, 1063 y 1298 pares de bases (pb).



## Cuadro 2. Secuencia de Oligonucleótidos para PCR

Oligonucleótidos	Secuencia	Genes
S19-1	5' TTGGCGGCAAGTCCGTCGGT 3'	eryC-eryD
S19-2	5' CCCAGAAGCGAGACGAAACG 3'	
RB51-1	5' TTAAGCGCTGATGCCATTCCTTCAC 3'	wboA
RB51-2	5' GCCAACCAACCCAAATGCTCACAA 3'	

### 5.4 Análisis estadístico

Se realizó un estudio transversal utilizando un muestreo por conveniencia para determinar la seroprevalencia de DVB, IBR, *Brucella*, *Neospora* y *Leptospira* en diferentes establos lecheros ubicados en algunos estados de la República Mexicana. A partir de este estudio se seleccionó la entidad federativa para efectuar los estudios de seguimiento comparativo entre animales con problemas reproductivos.

Se aplicó la prueba de  $\chi^2$  para probar la independencia respecto a la presentación de las enfermedades estudiadas y la entidad federativa, analizando una muestra de 8123 vacas ( $p < 0.05$ ).

Los grupos de animales con antecedente de aborto y los que no habían abortado se compararon mediante la prueba de  $\chi^2$  utilizando el procedimiento de tablas de contingencia usando para ello el programa “Paquete de diseños experimentales”<sup>24</sup> con una probabilidad  $p < 0.05$ .

En la localidad de Ixtlahuaca se compararon los niveles de anticuerpos para cada enfermedad utilizando un diseño completamente al azar acorde con el siguiente modelo:

$$\hat{Y} = \mu + T + \varepsilon$$

En donde:

$\hat{Y}_{ij}$  representa la observación i-ésima en el animal j-ésimo.

$\mu$  representa la media general.

$T_i$  representa el efecto del grupo los cuales son:

Abortadas, repetidoras, paridas, vaquillas abortadas y vaquillas gestantes.

$E_{ij}$  representa el error aleatorio asociado a cada observación.

En todos los casos se evaluó la significancia estadística mediante la prueba de la razón de la varianza ( F ) a una probabilidad  $p < 0.05$  utilizando para ello el programa Exel ®

## VI.- RESULTADOS

### **Etapa I:** Determinación de Seroprevalencias.

Los resultados obtenidos en cuanto a la seroprevalencia por estado para cada una de las enfermedades en estudio, mostró diversos porcentajes, por ejemplo la seroprevalencia de brucelosis fue alta en todos los Estados, siendo el Estado de Aguascalientes el de más alta seroprevalencia (20%) y los porcentajes más bajos se encontraron en el Estado de Veracruz y el Estado de México, que tuvieron una seroprevalencia del 3% en ambos casos; un comportamiento similar se observó para leptospirosis, donde la prevalencia más alta de igual manera que en brucelosis correspondió al Estado de Aguascalientes (27%) y la más baja para Veracruz (3%). En el caso de DVB e IBR las seroprevalencias más altas se observaron en Aguascalientes (88%) y Querétaro (86%) y las relativamente bajas en Veracruz con una seroprevalencia del 47% para DVB y 38% para IBR. El Estado de México presentó seroprevalencias del 75% en DVB y 56% en IBR. En cuanto a neosporosis la seroprevalencia en Veracruz fue del 15% y en los demás estados osciló entre el 30% y 45%. (Cuadro 3). El análisis de independencia con respecto a las enfermedades estudiadas y la entidad federativa, demostró que los porcentajes de seroprevalencia se encuentra afectada por la región geográfica ( $p < 0.05$ ).

### **Etapa II:** Estudio de caso.

De las 13 muestras de líquido abomasal, se obtuvieron 6 aislados con características morfológicas similares a *Brucella*. Al realizar la PCR en estas cepas se logró amplificar en todos los casos fragmentos de 456 y 1063 pb, que son específicos de *Brucella abortus* (cepa de campo) (Figura 1). En los tejidos de 4 fetos se observaron lesiones características de Brucelosis consistentes en hepatitis necrótica multifocal y bronconeumonía exudativa. El análisis serológico de las 55 vacas que tenían el historial de aborto mostró las siguientes seroprevalencias: brucelosis 27%; neosporosis 40%; leptospirosis 65% (títulos superiores a 1:400) e IBR, 100%.

**Etapa III:** Análisis serológico comparativo en diferentes grupos de vacas.

**Resultados de los ranchos del estado de Aguascalientes**

El estudio serológico entre las vacas abortadas y no abortadas que se realizó en seis ranchos lecheros de Aguascalientes, permitió hacer un análisis más detallado sobre las enfermedades abortivas. Los resultados más relevantes por enfermedad se describen a continuación:

**Brucelosis**

En el primer rancho, los resultados de las vacas abortadas como las no abortadas tuvieron un número alto de positivos, es decir, en el grupo de abortadas se obtuvieron 12 (60%) de animales positivos a rivanol. Por otro lado en el grupo de las no abortadas solo 9 (47%) fueron positivas. Como puede observarse en ambos casos el porcentaje de positividad es alto, sin embargo es más evidente en los animales del grupo de abortadas ( $p < 0.05$ ). (Cuadro 4)

Los ranchos 2 y 5 mostraron 0% de positividad a brucelosis en ambos grupos. (Cuadro 4)

La tercera unidad productiva en donde se contó con 9 animales con antecedente de aborto, sólo 6 de ellos fueron positivos a tarjeta y 3/6 a rivanol. De las vacas sin registro de aborto solo 3 se consideran positivas a brucelosis y las 5 restantes negativas. De igual forma que en el rancho 1 el mayor número de positivas, se encontró en el grupo de abortadas ( $p < 0.05$ ). (Cuadro 4)

De un total de 21 vacas abortadas del rancho 4, sólo 5 resultaron ser positivas a la prueba de RB y 3/5 son positivas a rivanol; de las no abortadas sólo 3 de 5 positivas a tarjeta también fueron positivas a rivanol. (Cuadro 4)

En el análisis del sexto rancho se puede observar que sólo un suero de los animales no abortados fue positivo a tarjeta y rivanol, las muestras restantes de ambos grupos resultaron negativas. (Cuadro 4)

### **Diarrea Viral Bovina**

Los resultados más relevantes se observan en el rancho uno, donde 14 vacas del grupo de abortadas resultaron positivas a DVB y solamente 8 del grupo de no abortadas. Encontrándose una asociación entre el número de animales positivos con el aborto ( $p < 0.05$ ). La diferencia más importante se puede observar en los valores de M/P que podrían ser indicativos del nivel de anticuerpos para este agente; los cocientes de M/P promedio en el grupo de animales no abortados (0.65) son menores a los encontrados en las muestras de animales del grupo de abortadas (0.92), sin embargo no se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). (Cuadro 5)

En los ranchos 2, 3, 5 y 6, el número de animales positivos es del 100% para ambos grupos y en los cocientes de M/P a pesar de ser altos no muestran diferencias significativas en ambos grupos ( $p > 0.05$ ). (Cuadro 5)

En el rancho 4 solo un suero de 20 fue negativo en el grupo de las vacas sin antecedente de aborto y el grupo contrario presentó el 100% de sueros positivos. Sin embargo se encontró diferencia significativa en los valores de M/P, que son un indicador del nivel de anticuerpos, el cual fue más alto en el grupo de abortadas ( $p < 0.05$ ). (Cuadro 5)

### **Rinotraqueitis Infecciosa Bovina**

Los resultados más relevantes se observan en la primera unidad productiva (rancho1), el cual presentó una positividad del 100% en los dos grupos, observando que las abortadas tuvieron en promedio un porcentaje de bloqueo más alto (89.48) que el grupo contrario (87.53), no encontrándose diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Las vacas abortadas del rancho 3 también presentaron un porcentaje de bloqueo superior al de las no abortadas que fue de 75.21% de bloqueo y las abortadas 82.21%, sin mostrar diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Un comportamiento similar se observa en el rancho 4 con 89.3% de bloqueo para las abortadas y 87.96% para las no abortadas. Por último el rancho 6 tuvo el porcentaje de bloqueo más alto en las abortadas que en las no abortadas. (Cuadro 6)

En ninguno de los ranchos se encontró diferencia significativa en los porcentajes de bloqueo para esta enfermedad ( $p > 0.05$ ).

### **Neosporosis**

En los ranchos 1, 2, 3, 4 y 5 se encontró una asociación entre el número de animales positivos a *Neospora caninum* y el aborto ( $p < 0.05$ ).

En el Rancho 5 se observa que los valores M/P, para las abortadas es de 4.02 % y las no abortadas 1.55%, a pesar de esto, no existió diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ). En el Rancho 6 ambos grupos fueron positivos, pero el promedio de los valores de M/P para cada grupo, es más alto para el caso de las abortadas (4.18 %) que para las no abortadas (3.22 %) sin encontrar una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). (Cuadro 7)

### **Leptospirosis**

Del total de los ranchos (6), sólo en el 3° se pudo detectar que *Leptospira* se encuentra afectando con la participación de las serovariedades wolffi y tarassovi; para *L. wolffi* los animales que abortaron presentan títulos que se encuentran, en su mayoría, arriba de 1:100 y hasta 1:400. Los animales que no habían abortado, en su mayoría fueron negativos ó con títulos inferiores a 1:100. En el caso de *L. tarassovi* el grupo de las vacas que abortaron presentaron títulos de 1:400 y las vacas sin historial de aborto por lo menos dos fueron negativas y cinco con títulos menores a 1:400. (Cuadro 8)

### **Resultados de los ranchos del Estado de México (Ixtlahuaca).**

Los resultados de las muestras también fueron analizadas de manera comparativa. En una de las unidades se procesaron 24 muestras serológicas y en la otra unidad 15 (5 de abortadas, 5 de no abortadas y 5 paridas).

### **Estudio serológico comparativo entre vacas abortadas, repetidoras, paridas, vaquillas abortadas y vaquillas gestantes.**

El rancho es considerado como hato libre de brucelosis y todos los resultados fueron negativos a la prueba de Tarjeta. Para IBR las 24 vacas presentaron el 100% de positividad;

sólo las abortadas presentaron mayor porcentaje de bloqueo (94.14%) y las vaquillas gestantes, el menor porcentaje de bloqueo (92,97%), sin mostrar diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). En el caso de DVB las abortadas y las paridas presentaron el 100% de positividad a diferencia de las vaquillas gestantes que en su totalidad fueron negativas. En la fila de DVB se puede observar que las vacas abortadas y repetidoras presentan valores de M/P superiores a las vacas paridas, las vaquillas abortadas y mucho más altos que las vaquillas gestantes, tampoco se logró demostrar una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). En cuanto a neosporosis, no se encontró diferencia entre los grupos ( $p > 0.05$ ). (Cuadro 9)

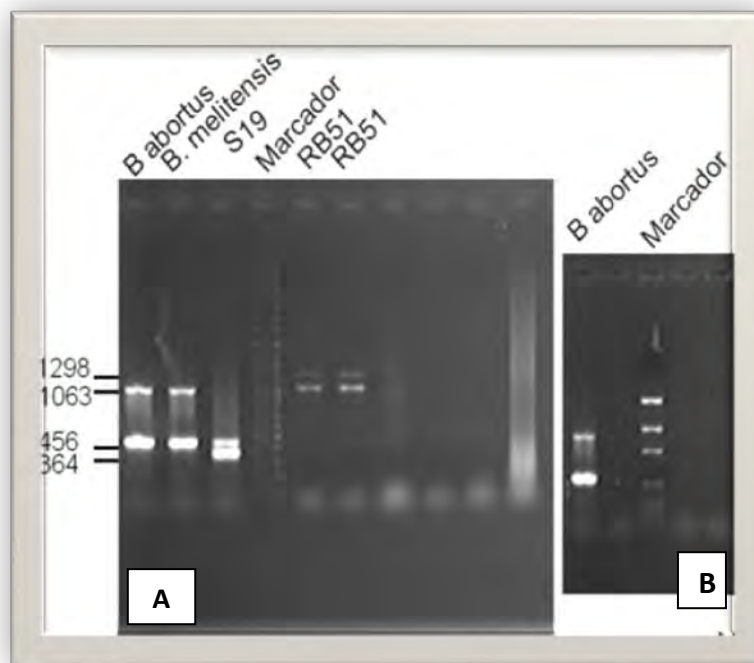
### **Estudio serológico comparativo entre vacas abortadas repetidoras y paridas.**

Los resultados de los tres grupos para Brucelosis se observan negativos. En Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, todos los grupos son positivos con porcentajes de bloqueo altos, encontrando más alto en las repetidoras y paridas, ambos grupos con un porcentaje de bloqueo del 94.02 %. Para DVB las vacas abortadas y repetidoras presentaron el 100% de positividad, pudiéndose observar que las paridas a diferencia de las abortadas y repetidoras presentan un menor valor de M/P (0.56 %). Los resultados del grupo de vacas con antecedente de aborto fueron los más relevantes en el caso de neospora, presentándose positivos en su totalidad. En el análisis estadístico no se encontró diferencia alguna entre los valores obtenidos de M/P y los grupos ( $p > 0.05$ ). (Cuadro 10)

**Cuadro 3. Seroprevalencia de enfermedades relacionadas con falla reproductiva (abortos) en bovinos de leche en diferentes Estados de la República Mexicana.**

<b>ESTADO</b>	<b>DVB</b>	<b>IBR</b>	<b>NEOSPORA</b>	<b>LEPTOSPIRA</b>	<b>BRUCELA</b>
<b>GUANAJUATO</b>	<b>80%</b>	<b>76%</b>	<b>45%</b>	<b>15%</b>	<b>17%</b>
<b>VERACRUZ</b>	<b>47%</b>	<b>38%</b>	<b>15%</b>	<b>3%</b>	<b>3%</b>
<b>QUERÉTARO</b>	<b>86%</b>	<b>85%</b>	<b>30%</b>	<b>20%</b>	<b>21%</b>
<b>EDO. DE MEX.</b>	<b>75%</b>	<b>56%</b>	<b>36%</b>	<b>18%</b>	<b>3%</b>
<b>AGUASCALIENTES</b>	<b>88%</b>	<b>77%</b>	<b>40%</b>	<b>27%</b>	<b>20%</b>





**Figura 1. Fragmentos amplificados en la PCR para la identificación de *Brucella* en aislamientos a partir del líquido abomasal de fetos abortados en un rancho en Aguascalientes, México. En el recuadro A se observan los fragmentos que se amplifican en las diferentes especies de *Brucella* y en el B los fragmentos de amplificación de una cepa aislada.**

**Cuadro 4: Estudio serológico comparativo entre vacas abortadas y no abortadas para Brucelosis utilizando la prueba de Rosa de Bengala al 8% y Rivanol.**

	PRUEBA		Rancho 1	Rancho 2	Rancho 3	Rancho 4	Rancho 5	Rancho 6
<b>ABORTADAS</b>	TARJETA AL 8%	(+)	14	0	6	5	0	0
		(-)	6	21	3	16	4	8
	RIVANOL	(+)	12	0	6	3	0	0
		(-)	2	0	3	2	0	0
<b>NO ABORTADAS</b>	TARJETA AL 8%	(+)	11	0	7	5	0	1
		(-)	8	26	2	15	7	8
	RIVANOL	(+)	9	0	3	3	0	1
		(-)	2	0	4	2	0	0

**Cuadro 5. Estudio serológico comparativo entre vacas abortadas y no abortadas para DVB.**

		Rancho	Rancho	Rancho	Rancho	Rancho	Rancho
		1	2	3	4	5	6
<b>ABORTADAS</b>	(+)	14	21	9	21	4	7
	(-)	6	0	0	0	0	0
	Promedio de M/P	0.92	1.31	1.34	1.19	1.32	1.09
<b>NO ABORTADAS</b>	(+)	8	26	7	19	7	9
	(-)	12	0	0	1	0	0
	Promedio de M/P	0.65	1.42	1.59	1.45	1.77	1.04

**Cuadro 6: Estudio serológico comparativo entre vacas abortadas y no abortadas para IBR.**

		Rancho	Rancho	Rancho	Rancho	Rancho	Rancho
		1	2	3	4	5	6
<b>ABORTADAS</b>	(+)	20	21	9	21	4	7
	(-)	0	0	0	0	0	0
	Promedio del porcentaje de bloqueo.	89.48	88.98	82.21	89.30	83.49	79.11
<b>NO ABORTADAS</b>	(+)	19	26	5	19	7	8
	(-)	0	0	2	1	0	1
	Promedio del porcentaje de bloqueo.	87.53	91.21	75.21	87.96	88.26	77.39

**Cuadro 7. Estudio serológico comparativo entre vacas abortadas y no abortadas para Neoporosis.**

		Rancho 1	Rancho 2	Rancho 3	Rancho 4	Rancho 5	Rancho 6
<b>ABORTADAS</b>	(+)	17	10	5	14	4	7
	(-)	3	11	4	7	0	0
	Promedio de M/P	2.52	1.77	0.95	2.10	4.02	4.18
<b>NO ABORTADAS</b>	(+)	19	18	4	14	6	9
	(-)	0	8	3	6	1	0
	Promedio de M/P	2.40	1.66	1.46	2.46	1.55	3.22

**Cuadro 8. Resultados de Leptospira del rancho 3 en el estudio comparativo de vacas con problemas reproductivos en Aguascalientes, México.**

Serovariedad	Wolffi	Hardjo	Tarassovi	H89	P.A
Vacas con antecedente de aborto	1:400	N	1:400	N	1:400
	N	N	1:400	N	N
	1:200	N	1:400	1:100	1:400
	1:100	N	1:400	N	N
	1:100	N	1:400	N	N
	1:100	N	1:400	N	N
	1:100	N	N	N	N
	N	N	1:200	N	N
Vacas sin antecedente de aborto	N	N	N	N	1:400
	1:100	N	1:400	N	N
	N	N	1:400	1:100	N
	1:100	N	N	N	1:200
	1:100	N	1:400	1:400	1:100
	N	N	1:400	N	N
	1:100	1:50	1:200	1:400	1:100
	N	N	N	N	N

N = Negativo.

**Cuadro 9: Estudio comparativo entre vacas abortadas, repetidoras, paridas, vaquillas abortadas y vaquillas gestantes en un rancho de Ixtlahuaca.**

			ABORTA- DAS	REPETIDORAS	PARIDAS	VAQUILLAS ABORTADAS	VAQUILLAS GESTANTES
<b>BRUCELOSIS</b>	TARJ. AL 8%	(+)	0	0	0	0	0
		(-)	5	5	5	5	4
<b>IBR</b>	(+)		5	5	5	5	4
	(-)		0	0	0	0	0
	Promedio del título de Ac.		94.14	94.07	93.63	93.99	92.97
<b>DVB</b>	(+)		5	4	5	2	0
	(-)		0	1	0	3	4
	Promedio del título de Ac.		1.05	1.18	0.59	0.58	-0.03
<b>NEOSPORA</b>	(+)		4	3	4	5	4
	(-)		1	2	1	0	0
	Promedio del título de Ac.		2.03	0.99	2.57	1.41	2.07

**Cuadro 10. Estudio comparativo entre vacas abortadas, repetidoras y paridas en un rancho lechero ubicado en Ixtlahuaca (Estado de México).**

			ABORTADAS	REPETIDORAS	PARIDAS
BRUCELOSIS	TARJETA AL 8%	(+)	0	0	0
		(-)	5	5	5
IBR		(+)	5	5	5
		(-)	0	0	0
		Promedio del título de Ac.	86.09	94.02	94.02
DVB		(+)	5	5	3
		(-)	0	0	2
		Promedio del título de Ac.	1.07	0.99	0.56
NEOSPORA		(+)	5	2	4
		(-)	0	3	1
		Promedio del título de Ac.	2.83	0.63	1.76



## VII.- DISCUSIÓN

Un problema serio para muchas enfermedades y en forma particular las de tipo reproductivo, es el diagnóstico. La mayoría de las técnicas que se utilizan para llegar hasta el diagnóstico etiológico, en múltiples ocasiones son inaccesibles. De aquí surgió la idea de hacer un perfil serológico donde en primera instancia se determinó la seroprevalencia de los principales agentes etiológicos que producen aborto en bovinos; en una segunda etapa se realizó un estudio de caso enfocado al diagnóstico definitivo para brucelosis y en la última etapa se planteó una estrategia para el diagnóstico diferencial de estas enfermedades basado en perfiles serológicos de animales con y sin historial de aborto.

Los resultados de la primera etapa demostraron seroprevalencias altas en la mayoría de las enfermedades, lo que concuerda con una gran variedad de estudios realizados por diversos autores en México y a nivel Mundial; por ejemplo, desde el año 1974 ya se había detectado la presencia de anticuerpos contra los virus de la diarrea viral bovina e IBR, *Brucella abortus* y *Leptospira pomona* en sueros de bovinos ubicados en el D.F., Estado de México y Yucatán, con historia clínica de problemas reproductivos, además de que nunca se vacunaron contra las enfermedades en estudio, excepto contra brucelosis, obteniendo resultados del 37.5% de sueros positivos a IBR, 75% a DVB, 17% para *B. abortus* y un 0% para *Leptospira pomona*.<sup>8</sup> Por otro lado en la república de Croacia, Biuk-Rudan, *et al* en 1999<sup>2</sup> realizaron un estudio donde determinan la prevalencia de anticuerpos contra el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (VIBR) y el virus de la diarrea viral bovina y su asociación con problemas de tipo reproductivo en suero de bovinos productores de leche. Los resultados demuestran seroprevalencias del 85.8% y del 79.2% para IBR y DVB respectivamente. En Chile se reportaron prevalencias en DVB del 69.2% y 59.7% en bovinos productores de leche.<sup>4</sup> Estos resultados muestran una alta similitud con los obtenidos en el presente trabajo. Además estos autores demostraron que ambos virus estaban asociados en un 80% con vacas que tenían problemas de tipo reproductivo.

En México, Magaña *et al.* (2005)<sup>17</sup> realizaron un estudio en el estado de Michoacán para determinar la prevalencia y los factores de riesgo en la rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros, los datos indican una relativa baja seroprevalencia individual para esta

enfermedad (22.0%) lo cual difiere con los resultados obtenidos en este trabajo (38% a 85%), sin embargo, estos autores reconocen, al hacer el análisis comparativo de sus resultados, que las prevalencias encontradas en otros estados son muy variables y alcanzan valores hasta del 84%, dato que corresponde a la Comarca Lagunera en la zona norte de México.

En el caso de brucelosis las prevalencias en México son muy variables y dependen mucho de diversos factores como la zona geográfica, el establecimiento de programas de control y profilaxis, el uso adecuado de las vacunas disponibles y la aplicación estricta de la norma oficial para el control y erradicación de la brucelosis (NOM-O41-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana para la Campaña nacional para el control y erradicación de la brucelosis en los animales.). Por ejemplo las prevalencias en Baja California oscilan entre el 2% y 8% con la aplicación de medidas de bioseguridad y del 32% al 52% sin la aplicación de programas de control.<sup>23</sup> En el estado de Querétaro y Guanajuato las prevalencias oscilan entre el 30% y 40%.<sup>12</sup>

Por su parte, la neosporosis es una enfermedad que en los últimos años ha tenido un impacto importante como causal de problemas reproductivos en ganado bovino. Esta enfermedad fue detectada en México en el año de 1997. Los estudios serológicos en México demuestran el 72% de frecuencia en hatos cuyo rango de abortos va del 13 al 30% y del 36% en unidades productivas con el 12% de casos de abortos. Actualmente se cree que la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en todo el territorio<sup>33</sup>, como también lo demuestra el presente estudio, donde se encontraron seroprevalencias del 15% al 45%. En otros países la situación no es diferente; en Italia las prevalencias por establo lechero que por lo menos tienen un animal seropositivo varían desde el 8 hasta el 54%.<sup>25</sup> En Barcelona, España se llevó a cabo el monitoreo de un rancho durante tres años consecutivos, determinando la seroprevalencia de *N. caninum*. Mediante la detección y eliminación de animales seropositivos se logró que la seroprevalencia fuese disminuyendo. Se encontró un 31.7% en el primer año de estudio, 24.8% en el segundo y 19.9% en el tercero.<sup>26</sup>

La leptospirosis que se caracteriza por infertilidad, reabsorciones embrionarias y abortos, también muestra prevalencias altas en los hatos lecheros y se ha determinado que el porcentaje de abortos asociados a esta enfermedad van del 8% al 14% y el título de anticuerpos en animales abortados es superior a 1:600 <sup>13</sup>

Todas estas enfermedades son de alto impacto en los establos lecheros ya que causan importantes pérdidas económicas entre las que destaca la eliminación de animales por disminución en sus parámetros productivos y reproductivos. En el estado de Aguascalientes se determinó que el 34% de animales eliminados de diferentes unidades productivas se debe a problemas de tipo reproductivo. <sup>41</sup>

En la segunda etapa donde se realizó el diagnóstico etiológico enfocado en brucelosis se logró el aislamiento e identificación por PCR de *Brucella abortus* a partir de líquido abomasal en seis de trece casos de aborto (46.15%) y en el 54% restante de las muestras no fue posible aislar al agente, por lo que es probable la participación de otros agentes en estos casos particulares; por ejemplo la seroprevalencia encontrada en las vacas con antecedente de aborto se determinó un 65% de animales positivos a leptospirosis con títulos mayores a 1:400.

De las enfermedades más estudiadas y para las que no existe problema para su diagnóstico es la Brucelosis, sin embargo, el problema fundamental ante esta situación es que en muchas explotaciones y principalmente en casos de aborto, se responsabiliza todo el problema a esta enfermedad, sin considerar la participación de otros agentes causantes de problemas reproductivos. Si bien la brucelosis, a pesar de toda la información que se ha generado para su control y profilaxis, sigue manteniendo una prevalencia alta en muchas explotaciones lecheras<sup>22</sup>, y no es el único agente responsable de todos los casos de aborto. Por ejemplo, es frecuente determinar por diferentes métodos, incluido el aislamiento, que de un 20 % a un 50 % de los casos de aborto, están asociados a *Brucella* y el otro porcentaje restante, en la mayoría de los casos no es diagnosticado, lo que genera que se tomen medidas incorrectas en programas de control y profilaxis; por ejemplo, es frecuente la vacunación y revacunación indiscriminada para esta enfermedad. Se ha observado en múltiples establos lecheros que vacunan contra brucelosis cada cuatro a seis meses aunque

la NOM-041-ZOO-1995 y la literatura mundial mencionan que la vacunación contra brucelosis se debe de llevar a cabo una sola vez en la vida del animal. En animales de 4-6 meses se debe utilizar la dosis clásica o completa y en vacas la dosis reducida.<sup>32</sup>

Por todo lo anterior, es que se hizo necesario establecer una estrategia que permitiese determinar los posibles agentes etiológicos involucrados en los casos de aborto. En la tercera etapa del proyecto de tesis, se hizo un análisis comparativo del perfil serológico entre grupos de vacas con y sin historial de aborto. Como se observó los resultados mostraron datos interesantes; en algunos ranchos fue posible demostrar la participación de otros agentes como el virus de la diarrea viral bovina e IBR, así como *Neospora* y *Leptospira* con y sin la participación de *Brucella* en casos de abortos. En un estudio realizado por Mark *et al*, (1990)<sup>39</sup> y utilizando una metodología similar a la del presente trabajo, lograron establecer diferencias significativas para los agentes causantes de la rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea viral bovina y leptospirosis entre grupos de vacas con y sin aborto. Por ejemplo, estos autores observaron títulos de anticuerpos para IBR (Antilog) de 32.33 y 22.42 en vacas con aborto y sin aborto, respectivamente. Estos autores, reportaron en uno de los ranchos títulos de 169.12 para DVB en vacas con antecedente de aborto y 143.57 para vacas sin este antecedente. En el caso de *Leptospira*, sus resultados tuvieron un comportamiento similar para las diferentes serovariedades de *Leptospira*. En otro estudio llevado a cabo por Lozada en 2004<sup>16</sup>, analizando diferentes grupos de vacas por serología para *Neospora caninum*, demostró una alta seropositividad para vacas con antecedentes de reabsorción embrionaria (48.1%) y aborto (71.8%), comparado con las que no presentaron problemas de tipo reproductivos (25.3%). Por los resultados obtenidos, estos autores concluyen que la serología comparativa es de alto valor diagnóstico en casos de aborto en unidades productivas grandes. Es conveniente reiterar que los resultados de este trabajo muestran una similitud con las del presente estudio. Sin embargo, al tratar de comparar los niveles de anticuerpos y a pesar de observar ciertas tendencias de mayor positividad en los valores M/P y porcentaje de bloqueo no fue posible encontrar diferencias significativas en la mayoría de los casos. Este tipo de metodología en la actualidad no se utiliza de manera rutinaria, principalmente debido al costo elevado de las pruebas; dado que, en la mayoría de los casos son de importación.

El estudio realizado en los ranchos de Ixtlahuaca donde se analizaron más grupos de animales, no fueron suficientes las muestras de suero como para poder demostrar estadísticamente una diferencia significativa entre los grupos para poder dirigirse hacia un diagnóstico más preciso.

Por otro lado, los resultados de un suero pareado en una vaca que sufrió de aborto, podría arrojar resultados contundentes para definir al agente etiológico involucrado, sin embargo en muchos casos, pueden estar involucrados varios agentes en la misma explotación, por lo que se hace necesario tener una visión integral de todos los posibles agentes. Además, cuando se tiene un manejo deficiente en las unidades productivas, algunos abortos pasan desapercibidos, no son notificados y los fetos rara vez son recuperados para estudio.

Otra observación importante, que se suscitó en el presente trabajo, fue el hecho que uno de los establos bajo estudio tenía un estatus de hato libre a brucelosis de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana, lo cual se corroboró con los resultados obtenidos en las pruebas realizadas en este establo; en un segundo caso donde se tenía el mismo estatus, fue posible detectar la presencia de 6/20 animales sero-reactores positivos a brucelosis. El número total de animales en esta explotación es de 220 vacas en producción y la presencia de animales seropositivos constituye un factor de riesgo para la diseminación de esta enfermedad.

Actualmente en México, se cuenta con información referente a la incidencia y prevalencia de la mayoría de los agentes etiológicos que afectan la fertilidad en el ganado bovino productor de leche, sin embargo estos estudios han sido de manera aislada y en muy pocos casos se analizan de manera integral.

Un problema serio para muchas enfermedades y en forma particular para las de tipo reproductivo, es el diagnóstico. La mayoría de las técnicas desarrolladas que derivan hasta el diagnóstico etiológico, no están disponibles o sólo se llevan a cabo en laboratorios especializados como los de investigación, sin considerar por supuesto su costo, que por lo general es alto.

Como pudo observarse, con los datos obtenidos en el estudio de prevalencias, es prácticamente imposible relacionar los abortos con algún agente en particular. Como puede observarse, la positividad y la prevalencia de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y Diarrea Viral Bovina, es alta. Sin embargo, es importante considerar que las pruebas utilizadas en el estudio de estas enfermedades, no discriminan entre anticuerpos vacunales y de infección donde prácticamente todos los animales resultan positivos a la prueba de ELISA. Se tiene que tomar en cuenta que la mayoría de las explotaciones lecheras cuentan con un programa intensivo de vacunación para estas dos enfermedades.

La Leptospirosis y la Neosporosis, en los últimos años han tenido un impacto importante como causales de aborto en bovinos lo cual se ve reflejado en prevalencias que van de un 15 % a un 40 %. En el caso particular de Neosporosis, no existe un programa de vacunación específico en ninguna de las unidades bajo estudio, por lo que es una de las enfermedades que se cree está causando un alto impacto en dichas unidades de producción.

Por último, a pesar de las intensas campañas dirigidas contra la Brucelosis y de la existencia de excelentes vacunas como la Cepa 19 y la RB51, sigue siendo una enfermedad con alta prevalencia en establos lecheros y que en el estudio de abortos, se debe establecer el diagnóstico etiológico, debido a que es frecuente implicar a la Brucelosis en la mayoría de los casos, dejando a un lado la participación de otros agentes.

## VIII.- CONCLUSIONES

- ✓ Se observó alta seroprevalencia para la mayoría de las enfermedades que causan problemas reproductivos en hatos lecheros en diferentes estados de la República Mexicana.
- ✓ Estas seroprevalencias altas, no permiten relacionar los trastornos reproductivos con algún agente de manera específica.
- ✓ El análisis de independencia con respecto a las enfermedades estudiadas y la entidad federativa, demostró que los porcentajes de seroprevalencia se encuentran afectadas por la región geográfica.
- ✓ En estudios de caso y contando con herramientas diagnósticas adecuadas como el PCR, se puede establecer un diagnóstico etiológico, como se demostró en el caso de *Brucella* que es uno de los principales agentes causantes de aborto, no obstante existen otros agentes infecciosos implicados en una misma unidad productiva.
- ✓ El análisis comparativo para las diferentes enfermedades, entre grupos de vacas con y sin historial de aborto y considerando sólo el número de animales positivos y negativos en los dos grupos, permite determinar la participación de uno o varios agentes en casos de aborto.
- ✓ La positividad alta y niveles altos de anticuerpos encontrados en *Neospora*, DVB e IBR, como sucede en otras enfermedades, no necesariamente son sinónimo de infección activa.
- ✓ El análisis comparativo integral entre vacas con y sin historial de aborto podría ser una herramienta diagnóstica si se toman en cuenta más variables.

## IX.- LITERATURA CITADA

1. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the brucellosis laboratory*. INRA: Francia, 1998.
2. Biuk-Rudan N, Cvetnić S, Madić J, Rudan D. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology* 1999; 51(5):875-881.
3. Bracho CA, Jaramillo ACJ, Martínez MJJ, Montaña HJA, Olgún A, Bernal. Comprobación de tres pruebas diagnósticas para el aborto por rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros. *Vet Méx* 2006; 37 (2) 151-163.
4. Celedon MO, Roco L, Quinteros G, Santibañez M, Berrios P. Puesta en evidencia del virus de la diarrea viral bovina en bovinos clínicamente afectados. *Arch Med Vet* 1997; 29 (2) 189-195.
5. Collantes FE, Rodríguez BA, Arnáiz SI, Moreno B, Aduriz G, Ortega MLM. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. *Theriogenology* 2006; 65(3):629-641.
6. Córdova LD, Hernández AL, Urrutia VRM, Moles CLP, García VZ, Folleto técnico de enfermedades que provocan aborto en bovinos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México, 2003.
7. Córdova LD, Rosado RM, García VZ, Guzmán RCC, Zacarías MML, López MJ, Mojarro.JFJ , Zermeño PA. Neosporosis. En: Enfermedades causantes de aborto bovino en Guanajuato. XXVI Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco, Gro. 2002.



8. Correa GP, Brown LN, Bryner JH. Presencia de anticuerpos contra rinotraqueitis Infecciosa, Diarrea Viral Bovina, Parainfluenza 3, Brucelosis, Leptospirosis y *Haemophilus somnus* en sueros de bovinos con problemas patológicos reproductores y respiratorios. Tec Pecu Méx 1975; (29):26-33
9. Dikken H, Kmety E. Serological typing methods of leptospire. Methods in Microbiology. Falta editorial, edición y lugar de edición 11, 259-307; 1978.
10. Fuentes DMD, Vitela MI, Arellano RB, Hernández CR, Morales AJF, Cruz VC, Suárez GF, Díaz AE. Presence of *Brucella abortus* vaccinal strain RB51 in vaginal exudates of aborted cows. Res J of Dairy Sci 2007 1(1-4):13-17.
11. Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª edición. MCGraw-Hill. Interamericana. México; 2000.
12. Herrera LE, Palomares REG, Ramírez MM, Díaz AE. Manejo de hato infectado por brucelosis en bovinos lecheros del estado de Guanajuato, México. XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Culiacán, Sinaloa. 2007.28
13. Herrera LE, Palomares REG, Ramírez MM, Díaz AE. Monitoreo serológico mensual durante 7 años de un hato bovino lechero infectado inicialmente por Brucelosis. XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Culiacán, Sinaloa. 2007.26
14. Innes EA. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. Parasitology 2007; 134(13):1903-1910
15. INTER-VET. Reproducción bovina. Editorial. Inter-Médica, Buenos Aires,

República Argentina. 1991

16. Lozada EF. Determinación de la presencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en hatos lecheros de la sierra Centro Norte del Ecuador, por Prueba Inmunoenzimática. [Tesis doctorado]. Ecuador. Universidad Central del Ecuador; 2004.
17. Magaña UA, Solorio RJL, Segura CJC. Rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros de la región Cotzco-Tejaro, Michoacán, México. *Téc Pecu Méx* 2005; 43(1):27-37.
18. Martínez CLC, Hernández CR, Vázquez NJ. Diagnóstico y control de la brucelosis animal. *Brucellosis 2005, International Research Conference, including the 58 th Brucellosis Research Conference*. Mérida Yucatán. México; 2005
19. Milián SF, García CL, Anaya EAM. Situación epidemiológica de las enfermedades reproductivas de los bovinos en México, 1990-2004 [resumen]. XXIX Congreso Nacional de Buiatría. Puebla Pue. 2005:
20. Moles CLP, Cisneros Puebla MA, Rosas DG, Serranía NR, Torres BJI. Serological study of bovine leptospirosis in Mexico. *Rev Cubana Med Trop*. 2002; 54(1):24-27.
21. Moles CLP, Guillén MAM, Leal GAJ, Gavaldón RD, Sánchez CYM, Diagnóstico serológico de brucelosis y leptospirosis en rumiantes de una comunidad en Guerrero [resumen]. XXIX Congreso Nacional de Buiatría. Puebla Pue. 2005.
22. Morales AJF. Causas de aborto en ganado lechero comunes en México. 2°

- Foro Estatal de Tuberculosis bovina y Brucelosis. Guadalajara, Jalisco. 2007.
23. Moreno RJF, Rentarías ETB, Searcy BR, Montañó GMF. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California. *Téc Pecu Méx* 2002; 40(3):243-249
  24. Olivares SE. Paquete de diseños experimentales. FAUANL. Versión 2.4. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L.1993.
  25. Otranto D, Lazari A, Testini G, Traversa D, Frangipane RA, Badan M, Capelli G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet Parasitol* 2003;118(1-2):7-18.
  26. Pabon M, Lopez-Gatius F, Garcia-Ispierto I, Bech-Sábat G, Nogareda C, Almeria S. Repetición de abortos asociados a *Neospora caninum*: estudio en una explotación durante 3 años.; *Red Vet* 2008; 9 (3): 1-3.
  27. Posadas ME, Peña BSD, Rivera VO. Enfermedades e Intoxicaciones en el Ganado Bovino.1ª Ed. Universidad Nacional Autónoma de México; 2006.
  28. Quevedo VJ, Chávez VA, Rivera GH, Casas AE, Serrano ME. Neosporosis en Bovinos lecheros en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. *Rev investig vet Perú* 2003; 14(1) 33-37
  29. Radostits. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol. II. 9ª edición, McGraw-Hill. Interamericana de España, S.A. 2002
  30. Rebhun WC. DVM. Enfermedades del ganado vacuno lechero. Ed. Acribia. Zaragoza España; 1999.

31. Romero V E, Hernández B J, Soto CR, Manejo especial de un hato infectado por Brucelosis en la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo [Resumen]. XXIX Congreso Nacional de Buiatria. Puebla Pue 2005.
32. SAGARPA. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. México, 1995.
33. Salinas MJA, Mora GJJ, Zárata RJJ, Rojas VVM, Hernández VG, Dávalos AG, *et al.* Frequency of *Neospora caninum* antibodies in cattle from northeastern Mexico. Vet Méx 2005, 36 (3).
34. Sánchez CE. Situación de la Brucelosis animal en México. IV Foro Nacional de Brucelosis. Ciudad de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autonoma de México. 2007.
35. Sangari FJ, Garcia Lobo JM, Agüero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. FEMS Microbiol 1994; 121:337-342.
36. Segura, CVM. Seroprevalencia de la leptospirosis bovina. Salud animal Tecnología disponible INIFAP. México, 1997-2003.
37. Segura-Correa VM, Solis-Calderon JJ, Segura-Correa JC. Seroprevalence of and risk factors for leptospiral antibodies among cattle in the state of Yucatan, Mexico. Trop Anim Health Prod. 2003; 35(4):293-299.
38. Solís CJJ. Salud animal. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR). Tecnología disponible INIFAP. México, 1997-2003.

39. Thurmond MC, Picanso JP, Hietala SK. Prospective serology and analysis in diagnosis of dairy cow abortion. *J Vet Diagn Invest* 1990 2:274-282.
40. Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 from other *Brucella* species and strains.; *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:760-764.
41. Vitela MI, Cruz VC, Ramos PM. Identificación de las causas de desecho en cinco establos lecheros de Aguascalientes, México. *Téc Pecu Méx* 2004; 42(3):437-444.
42. Wayne WD. Bioestadística. Base para el análisis de las Ciencias de la Salud. Limusa México; 1984:119-141