



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**IDENTIFICACIÓN DE AGENTES INFECCIOSOS PRESENTES
SIMULTÁNEAMENTE EN FETOS DE BOVINO ABORTADOS EN LA
CUENCA LECHERA DE TIZAYUCA, HIDALGO, MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

MVZ EDVA FABIOLA PREZA ROMERO

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. ELIZABETH MORALES SALINAS (FMVZ-UNAM)

COMITÉ TUTORAL:

M.C. ADRIANA MÉNDEZ BERNAL (FMVZ-UNAM)

DR. ÁLVARO AGUILAR SETIEN (CMN SIGLO XXI)

Ciudad Universitaria Cd. Mx

Octubre 2018



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

A mi valiosa y amada familia, mi mamá Evangelina Romero Vargas, mi papá Germán Preza Méndez, mi hermanito querido Iván (Anchu) y mi hermana mayor Susana porque gracias a su inmenso amor y cuidados me he convertido en una persona exitosa, fuerte y feliz. A mis sobrinos que son como mis angelitos Diego, Karla y Salvador. A mi cuñado Shark (Héctor) quien me ha tendido su mano amiga, comprensión y apoyo. A mis primos Julio e Ismael porque siempre tiene una sonrisa y tiempo para charlar conmigo.

A Carlos Hernández López porque junto a él he hallado la estabilidad y el amor que llevo en mi corazón ♥

A mis queridos amigos Silvi y bebé Sarita, Renee, Mauricio, los venenos 456 (Elenita, Lucio, Dario, Motita, CD y Aarón), Chuy y Luis Mario por su cariño y amistad sincera.

Al Doctor Jorge Hernández, Mario Martínez y Lourdes Juárez por impulsar en mí el deseo de mejorar y superarme académica.

A mi abuelita Enedina que me brindo su amor en vida, a Yoyito quien dejó su huellita en mí y a Mia (gatota).

AGRADECIMIENTOS

A mi amiga y guía académica la Doctora Elizabeth Morales Salinas, quien depositó su confianza y sembró en mi las maravillas de la investigación, quien, si no a usted a quien debo este grado, mi gratitud infinita. Porque para ser la mejor hay que aprender de los mejores.

Al MMVZ Adán Bedolla Alva por expresarme su apoyo y hermosa amistad desde el inicio de mi carrera como patóloga.

A la Doctora Adriana por toda su paciencia, trabajo y amistad.

Al Doctor Nestor por capacitarme en las técnicas moleculares.

Al Doctor Félix por sus enseñanzas en la estandarización de PCR para Neosporosis.

A la Doctora Frida Salmerón Sosa por su ayuda con la parte Estadística del trabajo.

A Pablo Pintor por su ayuda en el laboratorio y al Dr. Rogelio Alonso por su apoyo en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Francisco Carvallo Chagneau, Dr. Fernando Osnaya Gallardo y al Dr. Arturo Federico Olgúin Bernal por sus valiosas observaciones que ayudaron a enriquecer el trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Antecedentes	5
1.2 Impacto económico	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Causas de aborto en ganado bovino	7
2.2 Gestación en la vaca	11
2.3 Mecanismo del aborto (Estrés fetal)	17
2.4 Diarrea Viral Bovina	18
2.4.1 Características	18
2.4.2 Clasificación	18
2.4.3 Patogenia	19
2.4.4 Diagnóstico	21
2.5 Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR)	22
2.5.1 Características	23
2.5.2 Clasificación	23
2.5.3 Propiedades Físicoquímicas	24
2.5.4 Patogenia	25
2.5.5 Diagnóstico	27
2.6 Brucelosis	28
2.6.1 Características del agente	28
2.6.2 Clasificación	30
2.6.3 Patogenia	30
2.6.4 Diagnóstico	32
2.7 Leptospirosis	34
2.7.1 Características del agente	35
2.7.2 Patogenia	36
2.7.3 Diagnóstico	36
2.8 Neosporosis	37
2.8.1 Características	38
2.8.2 Diagnóstico	39
2.9 Otras enfermedades infecciosas abortivas	41
3. JUSTIFICACIÓN	43

4.	OBJETIVO GENERAL	44
5.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
6.	HIPÓTESIS	46
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	47
7.1	Lugar de estudio	47
7.2	Material biológico	47
7.3	Histopatología	47
7.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48
7.4.1	Extracción de DNA y RNA	49
7.4.2	Desarrollo de PCR para DVB	50
7.4.3	Desarrollo de PCR para BHV-1	51
7.4.4	Desarrollo de PCR para <i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar <i>Hardjo</i> , <i>L. interrogans</i> serovar <i>Pomona</i> , <i>Leptospira kirschneri</i> serovar <i>Grippotyphosa</i>	51
7.4.5	Desarrollo de PCR para <i>Brucella abortus</i>	52
7.4.6	Desarrollo de PCR para <i>Neospora caninum</i>	53
7.5	Estudio serológico	54
7.6	Encuesta	55
7.7	Análisis de los datos	56
8.	RESULTADOS	57
8.1	Histopatología	57
8.2	PCR y PCR-RT	63
8.3	Serología	67
8.3.1	Leptospirosis	67
8.3.2	Neosporosis, Diarrea Viral Bovina e IBR.	70
8.3.3	Brucelosis.	71
8.5	Comparación de resultados	74
8.6	Resultados del análisis estadístico	76
8.6.1	Análisis por órgano y agente infeccioso con la técnica de PCR y PCR-RT	76
8.6.2	Concordancia por órgano entre estudio histopatológico, PCR y PCR-RT	77
8.6.3	Asociación entre el grado de lesión por órgano en estudio histopatológico y PCR	78
8.6.4	Asociación de diagnóstico presuntivo en estudio histopatológico con pruebas moleculares y serología	80
8.6.5	Asociación de Serología de las madres y las Pruebas moleculares	82
8.6.6	Concordancia entre el Diagnóstico integral y Pruebas específicas (Estudio histopatológico, Pruebas moleculares y Serología)	82
8.6.7	Frecuencia de agentes infecciosos por feto y correlación múltiple en el diagnóstico integral	90

8.7 Resultados de frecuencia de abortos por tercio de gestación	93
9. <i>DISCUSIÓN</i>	94
10. <i>CONCLUSIONES</i>	110
11. <i>LITERATURA CITADA</i>	118

LISTA DE CUADROS

Número de cuadro	Título del cuadro	Página
1	Lesiones histológicas observadas en los órganos de 20 fetos	58
2	Lesiones histológicas encontradas en 20 fetos abortados de acuerdo al grado de lesión	61
3	Resultados de PCR y PCR-RT por cada órgano de cada feto	63
4	Resultados de PCR Y PCR-RT por feto de acuerdo a cada enfermedad	66
5	Titulación de sueros de madres que presentaron el aborto con panel de 12 serovariedades de <i>Leptospira</i> .	68
6	Sueros positivos y negativos de madres que presentaron el aborto con panel de 12 serovariedades para <i>Leptospira</i>	69
7	Detección de anticuerpos por ELISA contra IBR, DVB y Neosporosis en las 20 vacas que abortaron	70
8	Sueros positivos y negativos de las madres, en la prueba de Tarjeta y de Rivanol contra <i>Brucella abortus</i>	71
9	Resultados de la Encuesta	73
10	Comparación de histopatología, PCR, PCR-RT y Serología	74
11	Kappa Cohen. Concordancia de lesiones en cerebro, estudio Histopatológico y PCR para Neosporosis	77
12	Asociación entre el grado de lesión y el resultado por PCR en cerebro para IBR	78
13	Asociación entre el grado de lesión y el resultado por PCR en Hígado para Brucelosis	79
14	Asociación entre el diagnóstico presuntivo y el resultado por PCR para IBR	81
15	Asociación entre el Diagnóstico Integral e Histopatología para IBR	83
16	Asociación entre el Diagnóstico Integral y PCR para IBR	84
17	Asociación entre el Diagnóstico Integral y Serología para DVB	85
18	Asociación entre el Diagnóstico Integral y PCR-RT para DVB	86
19	Asociación entre el Diagnóstico Integral y Serología para Neosporosis	87
20	Asociación entre el Diagnóstico integral y PCR para Brucelosis	88

LISTA DE CUADROS

Número de cuadro	Título del cuadro	Página
21	Asociación entre el Diagnóstico integral y Serología para Brucelosis	88
22	Asociación entre el Diagnóstico integral y Serología para Leptospirosis	89
23	Asociación entre el Diagnóstico integral y PCR para Leptospirosis	90
24	Número de agentes infecciosos involucrados en el aborto	91
25	Prueba de Rho de Spearman correlación múltiple entre los agentes infecciosos involucrados en el aborto de 20 fetos de bovino.	92
26	Frecuencia de abortos por tercio de gestación y Diagnóstico Integral	93

LISTA DE FIGURAS

Número de Figura	Título del cuadro	Página
1	Principales agentes infecciosos involucrados en el aborto bovino.	8
2	Sección histopatológica de pulmón H.E. 40x. Feto 12.	113
3	Sección histopatológica de hígado H.E 4X. Feto 11.	113
4	Sección histopatológica de cerebro H.E. 40x Feto 3.	114
5	Sección histopatológica de cerebro H.E. 100X. Feto 3.	114
6	Sección histopatológica de Cerebro H.E. 40 X. Feto 14.	115
7	Gel de agarosa 1% PCR-RT DVB de los órganos del feto 18. Teñido con bromuro de etidio	115
8	Gel de agarosa 1% PCR <i>Leptospira sp.</i> de los órganos del feto 17. Teñido con bromuro de etidio	116
9	Gel de agarosa 1% PCR IBR de los órganos del feto 10. Teñido con bromuro de etidio.	116
10	Gel de agarosa 1% PCR <i>Brucella abortus</i> de los órganos del feto 4. Teñido con bromuro de etidio.	117

RESUMEN

Se recolectaron cinco órganos (corazón, pulmón, hígado, riñón y cerebro) de 20 fetos abortados en la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo. Se realizó la identificación de cinco enfermedades involucradas en el aborto bovino; IBR, Neosporosis, DVB, Leptospirosis y Brucelosis. A cada órgano se le realizó estudio histopatológico, PCR y su variante PCR-RT para identificar a cada uno de los agentes antes mencionados. También se tomaron muestras de suero de las madres que presentaron el aborto. La frecuencia de abortos fue para el segundo trimestre de gestación 7 abortos y para el tercer trimestre de gestación 13 abortos. Se encontró que el uso de cualquier de estos cinco órganos es igualmente útil para el diagnóstico de estas enfermedades en pruebas moleculares. Hubo concordancia para Neosporosis entre las lesiones encontradas por histología en cerebro con los resultados de PCR para este mismo órgano ($P=0.068$). Para IBR existió asociación entre el grado de lesión en cerebro y el resultado de PCR para este mismo órgano ($P=0.014$). Para Brucelosis hubo asociación entre el grado de lesión encontrada por histología en hígado con los resultados por PCR para este mismo órgano ($P=0.038$). Para Leptospirosis, Neosporosis y DVB no existió asociación entre el grado de lesión encontrada por histología en corazón, pulmón, hígado, riñón y cerebro con los resultados en PCR para estos mismos órganos ($P>0.05$). El resultado estadístico fue significativo ($P=0.061$) entre los resultados histopatológicos y el PCR para IBR, por lo tanto, si están asociados. Para DVB en la prueba de serología y PCR-RT hubo concordancia con el diagnóstico integral ($P=0.028$) y ($P=0.002$), respectivamente. Para IBR el estudio histopatológico y el PCR se observó concordancia con el diagnóstico integral ($P>0.05$). Para Neosporosis la prueba

de PCR y Serología tuvieron concordancia con el diagnóstico integral ($P=0.0001$). Para Brucelosis en la prueba de PCR y Serología hubo concordancia con el diagnóstico integral ($P<0.05$). Para Leptospirosis en la prueba de Serología tuvo concordancia con el diagnóstico integral ($P=0.0003$). Aunque se comprobó que el aborto esta ocasionado por más de un agente infeccioso en el 90% de los casos, no existió significancia estadística que evidenciara una correlación entre los agentes infecciosos.

Palabras clave: Aborto, IBR, DVB, Brucelosis, Leptospirosis, Neosporosis, Serología, PCR, PCR-RT, Histopatología, Bovino

ABSTRACT

Five organs (heart, lung, liver, kidney and brain) were collected from 20 aborted fetuses in the Valley of Tizayuca, Hidalgo. The identification of five diseases involved in bovine abortion was carried out; IBR, Neosporosis, DVB, Leptospirosis and Brucellosis. Each organ underwent histopathological study, PCR and its PCR-RT variant to identify each of the aforementioned agents. Serum samples were also taken from mothers who had an abortion. The frequency of abortions was for the second trimester of pregnancy 7 abortions and for the third trimester of pregnancy 13 abortions. It was found that the use of any of these five organs is equally useful for the diagnosis of these diseases in molecular tests. There was agreement for Neosporosis among the lesions found by brain histology with the results of PCR for this same organ ($P = 0.068$). For IBR there was an association between the degree of brain injury and the result of CRP for this same organ ($P = 0.014$). For Brucellosis there was an association between the degree of lesion found by liver histology and the results obtained by PCR for this same organ ($P = 0.038$). For Leptospirosis, Neosporosis and DVB there was no association between the degree of lesion found by histology in heart, lung, liver, kidney and brain with PCR results for these same organs ($P > 0.05$). The statistical result was significant ($P = 0.061$) between the histopathological results and the PCR for IBR, therefore, if they are associated. For DVB in the serology test and RT-PCR there was concordance with the integral diagnosis ($P = 0.028$) and ($P = 0.002$), respectively. For Neosporosis the PCR and Serology test were in agreement with the integral diagnosis ($P = 0.0001$). For Brucellosis in the PCR and Serology test there was concordance with the integral diagnosis ($P < 0.05$). For Leptospirosis in the Serology test there was concordance with the

integral diagnosis ($P = 0.0003$). Although it was found that abortion is caused by more than one infectious agent in 90% of the cases, there was no statistical significance that showed a correlation between the infectious agents.

Key words: Abortion, IBR, DVB, Brucellosis, Leptospirosis, Neosporosis, Serology, PCR, RT-PCR, Histopathology, Cattle

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En 2015, México ocupó la novena posición en la producción mundial de leche. Dos de cada 100 litros que se producen en el mundo son de origen mexicano. Al cuarto trimestre de 2015, la producción de leche de bovino en México alcanzó 11 394 millones de litros (2.4% más que en el mismo periodo de 2014). Para el 2016, se estimó que la producción de leche alcanzaría 11 475 millones de litros. Aun cuando se observa un ligero incremento en la producción de leche, esta no es suficiente debido al crecimiento demográfico en México y por esta razón para 2015 se importaron 259 479 toneladas de leche en polvo, lo que significa un aumento de 81% en diez años. En cuanto a los derivados lácteos como quesos, crema y yogurt, al concluir el mes de noviembre de 2015, la producción alcanzó un volumen de 1 030 679 toneladas, con un valor de 39 507 millones de pesos. Por su parte, la industria de quesos produjo 332 251 toneladas con un valor en el mercado de 15 351 millones de pesos. De acuerdo a estos datos, se infiere que la producción de leche sigue siendo una de las industrias alimenticias más importantes en México. Sin embargo, uno de los principales problemas que disminuyen considerablemente la producción de leche en México y en el mundo, es la pérdida de la gestación en el ganado bovino (SAGARPA, 2015).

En México los principales estados productores de leche en orden descendente son: 1. Jalisco, 2. Coahuila de Zaragoza, 3. Durango, 4. Chihuahua, 5. Guanajuato, 6. Veracruz de Ignacio de la Llave, 7. México, 8. Puebla, 9. Hidalgo, 10. Chiapas, 11. Aguascalientes y 12. Querétaro Arteaga (Boletín sobre el sector lechero, 2016).

El estado de Hidalgo entre los años 2013-2015 representó el 3.8 % de la producción nacional total de leche. En el año 2015 produjo 317 993 miles de litros de leche y en septiembre del 2016, se tienen contabilizados 317 707 miles de litros de leche. Este estado desempeña un papel importante en la producción de leche nacional. La cuenca lechera de Tizayuca ubicada en este estado, contribuye a dicha producción (Boletín sobre el sector lechero, 2016).

1.2 Impacto económico

De acuerdo a un estudio realizado en Estados Unidos de América (EUA), la pérdida de la gestación tiene un alto costo, calculado en 555 USD (dólares americanos) y este costo se incrementa a medida que avanza la gestación (De Vries, 2006). Al respecto, en otro estudio realizado en Corea, se calcularon pérdidas de 2,333 USD promedio por aborto, debido principalmente a un mayor intervalo entre partos y un incremento en la tasa de desecho, consecuencia de una disminución en la fertilidad, que se manifestó como endometritis en un 22.3 % de los animales abortados y un 46.6 % de animales eliminados del hato como consecuencia del aborto (Lee y Kim, 2007). En México se cuenta con poca información al respecto.

En un estudio realizado por el Comité Técnico sobre aborto bovino en la Comarca Lagunera, México en 1998, se estimó que el costo por aborto en vacas de primer parto es de \$ 10,684.20 y en vacas de segundo parto o más partos el costo es de \$ 12,549.60. Los costos se atribuyeron a la alimentación, disminución en la producción de leche, medicamentos, inseminación artificial y pérdida por reemplazos de animales (Comité Técnico sobre aborto bovino en la Comarca Lagunera, 1998).

En un estudio económico que se llevó a cabo en la cuenca lechera de Tizayuca en 2011, se concluyó que el impacto de un aborto se ve reflejado en una disminución de las ganancias de 5600 pesos y no como una pérdida económica para el productor, pero esto se atribuye a que no se tomaron en cuenta los costos de instalaciones, manejo, tratamiento de madres que abortaron y número de inseminaciones entre otras causas (Rogel., 2011).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Causas de aborto en ganado bovino

Los abortos en vacas lecheras se han convertido en un problema económico importante que puede presentarse en cualquier parte del mundo. Este fenómeno es relevante debido a que afecta la reproducción asociada a metritis o infertilidad, disminución de la generación de reemplazos que repercute en el mejoramiento de selección genética, baja en el pico de producción de leche, disminución en la obtención de productos derivados de la leche, aumento en los costos de producción, alimentación, instalaciones, manejo, número de servicios, entre otras y además costos por tratamiento en las vacas que han abortado.

El aborto puede definirse como la terminación prematura de la gestación con muerte o pérdida del feto y su expulsión. El periodo gestacional que abarca en bovinos es a partir del día 42 (tiempo estimado de la fijación del embrión) hasta los 280 ya que después de estos días el feto cuenta con las condiciones necesarias para sobrevivir fuera del útero. Las pérdidas que ocurren antes de los 42 días son consideradas reabsorciones embrionarias, entre los 42 días hasta

260 días es aborto y el nacimiento del producto de los 260 días hasta antes de la fecha esperada de parto, son partos prematuros (Forar, col; 1994).

Los abortos se han clasificado según su origen en dos categorías: infeccioso y no infeccioso, Figura 1.

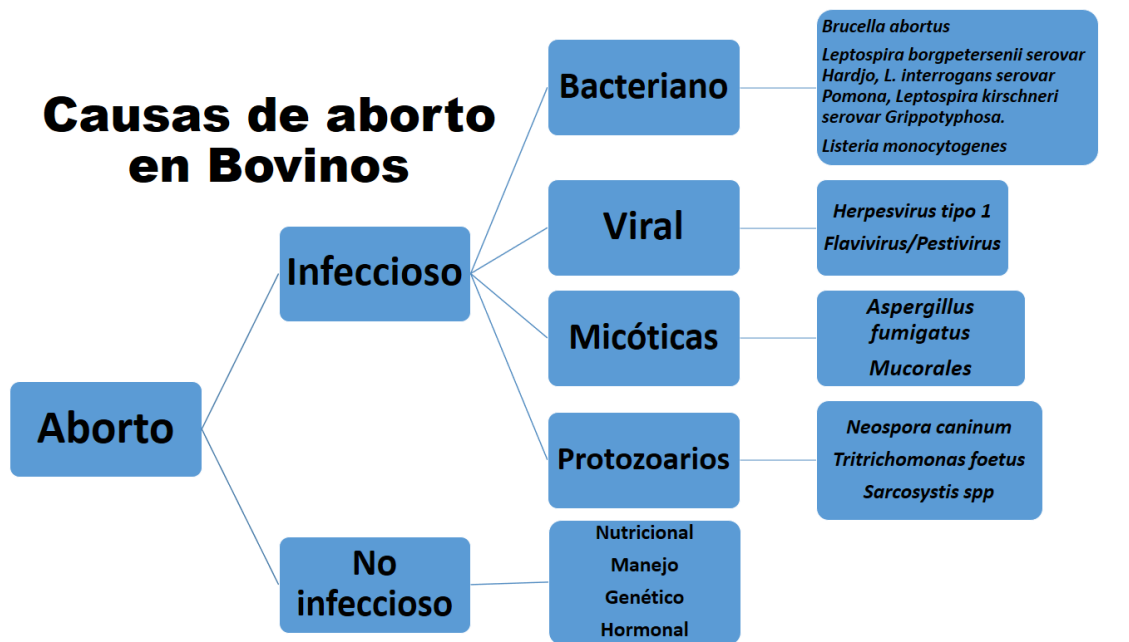


Figura 1. Principales agentes infecciosos involucrados en el aborto bovino.

En una revisión sobre los primeros reportes de prevalencia de abortos en vacas lecheras, realizado en 6 países en diferentes décadas, se informa que en el Reino Unido la frecuencia fue de 5.5% durante el año 1936, donde solo se incluyeron los abortos observados. Para Australia en 1984 el estudio incluyó abortos no observados con una frecuencia de 7.3%. En el caso de EUA, tomando cuenta a diferentes estados e incluyendo a los abortos observados y no observados, se obtuvieron frecuencias para Wisconsin de 6.4% (1948) y 10% (1952); Minnesota y Wisconsin, 6.1% (1984); Ohio, 5.3% (1969); Missouri, 5.6% (1968); Colorado, 6.6% (1978); Washington y Idaho, 3.6% (1976); California,

8.4% (1986) y 10.6% (1984); y para el norte de los Estados Unidos, 7.5% (1980). Se concluye que las diferencias regionales pueden influir en la prevalencia de los agentes infecciosos, la genética, los alimentos, el clima y la vivienda, así como otros factores. Esto demuestra la antigüedad del problema (Forar y col., 1994).

En EUA se ha estimado que sólo se diagnostica del 25 al 40 % de las causas de aborto, aun cuando se remite el feto al laboratorio (Mickelsen y Evermann, 1994; Anderson, 2007). Uno de los principales factores que contribuyen a este bajo porcentaje, es que en un aborto puede estar involucrado más de un agente etiológico y con frecuencia sólo se busca la identificación del agente del cual se tenga la mayor sospecha. En México no se cuenta con estadísticas al respecto, sin embargo, los datos podrían ser similares a los de EUA. En diversas áreas de EUA, se han realizado encuestas en dónde se ha determinado que existen diferencias en los agentes infecciosos causantes de aborto en bovinos, lo que puede deberse a factores como el clima, el tipo de producción, la alimentación, prácticas de manejo, programas de vacunación, así como los procedimientos de muestreo y de laboratorios disponibles en el momento. Alrededor del 90% de las causas de aborto bovino se atribuyen a agentes infecciosos como bacterias, virus, protozoarios y hongos; y el resto se deben a causas nutricionales, genéticas, endócrinas, físicas y tóxicas, (Campero y col., 2003; Anderson, 2007).

En un estudio realizado en Brasil en los años 1954-2004, se colectaron 42 muestras de fetos de bovino abortados, 4 mortinatos, 28 órganos de fetos y 14 placentas embebidos con parafina para hacer diagnóstico de aborto bovino empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus

variantes. Se identificaron 12 agentes infecciosos involucrados comúnmente en los abortos. El agente *Brucella abortus* fue detectado en 12 casos, *Salmonella* sp. solo en dos fetos y de estos, un caso también fue positivo a *Neospora caninum*. Cabe mencionar que solo en el 19% de los casos se pudo establecer un diagnóstico (Teane y col. 2010).

En un estudio de serología donde se tomaron 8 123 sueros procedentes de bovinos en México, que contemplo a los estados de Veracruz, Aguascalientes, Querétaro, Guanajuato y Estado de México, se encontraron diferentes seroprevalencias para cada estado. En el caso de Leptospirosis y Brucelosis el estado con mayor seroprevalencia fue Aguascalientes con 27% y el más bajo fue Veracruz con el 3%. Para Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) la seroprevalencia mas alta se encontró en el estado de Aguascalientes con 88% y Querétaro con 86% y las más bajas en Veracruz con 47% para DVB y 38% para IBR. Para Neosporosis las seroprevalencias en estos estados osciló entre 30% - 45% (Zenteno, 2008).

En un estudio serológico que se realizó en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), en el estado de Hidalgo, México, se observó que la frecuencia de abortos por *Neospora caninum* fue del 48.65%, para *Herpesvirus bovino 1* (Rinotraqueítis infecciosa bovina) del 35.18% y para *Brucella abortus* del 32.18% (Sánchez y col.,2008).

En otro estudio se informó que las frecuencias de abortos en el CAIT ocurrían con mayor frecuencia en el tercer tercio de la gestación tanto en hatos segregados (con brucelosis y tuberculosis) como en hatos libres de estas enfermedades. El promedio de días abiertos para ambos casos se encontraba

entre 249-251 días (Rogel, 2011). Es importante tomar en cuenta que algunos estudios mencionan la posible interacción de más de un agente abortivo, tanto por estudios serológicos como por PCR. Por ejemplo, en Brasil se tomaron muestras de 124 fetos. Se encontró que el 13.7% de las muestras fueron positivas para *Bucella* spp. 3.2% para *Leptospira* spp., 2.4 %, para DVB e IBR, y solo 0.81% en asociación entre estos dos últimos virus (Cortez y col. 2006); y en un estudio de serología realizado en el mismo país donde se recolectaron 35 muestras de sangre con el propósito de buscar asociaciones de *Neospora caninum* con otros agentes infecciosos, se concluyó que existe co-infección con otros agentes abortivos como Herpes Virus Bovino tipo I (BHV-1) y DVB. (Santos y col. 2005).

2.2 Gestación en la vaca

El ciclo gestacional en la vaca dura en promedio 270-280 días.

El éxito de la gestación en las vacas requiere de múltiples hormonas reproductivas que interactúan con sus órganos blanco como el ovario, el útero y la glándula mamaria.

La actividad de estas hormonas comienza en las neuronas hipotalámicas con la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), por medio de la despolarización de la membrana neuronal. La hormona tiene efecto en la adenohipófisis que induce la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), ambas hormonas interactúan de manera dinámica y positiva para el desarrollo de los ovocitos y su posterior ovulación.

Así en la vaca pueden distinguirse cuatro etapas del ciclo estral como el proestro, estro, metaestro y diestro (Galina y Valencia, 2008).

En el proestro la FSH se encuentra en baja concentración, a diferencia de la LH debido al efecto que el estradiol tiene sobre ella ya que la estimula de forma positiva incrementando su secreción (Galina y Valencia, 2008). La disminución en las concentraciones de progesterona tiene como efecto el incremento de la GnRH en hipotálamo y de receptores en la hipófisis aumentando la liberación de LH.

En el estro se da la ovulación por la interacción positiva entre el estradiol y la LH dando lugar al pico preovulatorio de LH en el ovario donde el folículo ya se ha desarrollado hasta su madurez. En esta etapa el estrógeno es el responsable de la conducta sexual (Galina y Valencia, 2008).

En el metaestro la aceptación sexual ha concluido, pero hay un cuerpo lúteo conformado por células de la granulosa y teca luteinizadas, en este momento las concentraciones de estrógeno disminuyen y las de progesterona van en aumento. En caso de haber existido fertilización de ovocito el cuerpo lúteo ayuda al mantenimiento de la gestación, y si no da lugar a la destrucción del cuerpo lúteo por prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). (Galina y Valencia, 2008).

Cuando se ha llevado a cabo con éxito la fertilización del ovocito, el cuerpo lúteo se encuentra bien establecido. En esta etapa la progesterona alcanza sus máximas concentraciones, retroalimentando de forma negativa a la LH, inhibiendo receptores de GnRH en la hipófisis. (Galina y Valencia, 2008).

Gestación: El establecer la gestación, es el objetivo principal de los programas reproductivos. Después de la fertilización el cigoto se divide, dando como resultado embriones de dos, cuatro, ocho, dieciséis células, y en el día siete el embrión tiene más de 80 células. Entre los días 16 a 18 del ciclo estral el embrión se alarga y alcanza una longitud de 15 cm. El establecimiento de la gestación depende de que el embrión suprima la secreción de la PGF2 α , mediante la secreción de interferón-tau (INT τ).

Fertilización: Es el proceso mediante el cual los gametos, macho y hembra, se unen para formar el cigoto, célula a partir de la cual se desarrollará un nuevo individuo. La fertilización inicia con la penetración del espermatozoide y termina con la unión de los dos juegos haploides de cromosomas; proceso conocido como singamia (Senger, 2003).

Antes de la fertilización los espermatozoides deberán capacitarse, es decir, deberán ocurrir en ellos cambios morfológicos y fisiológicos que los habiliten para fertilizar. Estos cambios comprenden un aumento en la movilidad y la fusión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática, con el propósito de liberar acrosina y hialuronidasa; este proceso se conoce como reacción acrosomal y es el cambio más importante, ya que, de no ocurrir, el espermatozoide es incapaz de fertilizar (Senger, 2003).

Por su parte el ovocito, como consecuencia del pico preovulatorio de LH, reinicia la meiosis, la cual fue suspendida en la profase de la primera división meiótica al momento del nacimiento. El ovocito se libera cuando se encuentra en la metafase de la segunda división meiótica; en esta etapa la meiosis se detiene y se reactiva cuando penetra el espermatozoide (Galina y Valencia, 2008)

La penetración del espermatozoide es facilitada por la acción de la hialuronidasa y acrosina. Una vez que la membrana plasmática del espermatozoide entra en contacto con la membrana vitelina, se fusionan, incorporándose la cabeza del espermatozoide en el citoplasma del óvulo; posteriormente el núcleo del espermatozoide se transforma en el pronúcleo masculino y simultáneamente la cromatina del óvulo forma el pronúcleo femenino.

Con la penetración del espermatozoide al ovocito, se activa el mecanismo de bloqueo de la polispermia; el cual se consigue mediante la liberación de sustancias contenidas en los gránulos corticales y provocan cambios bioquímicos en la zona pelúcida (Senger, 2003).

Desarrollo embrionario

Se conoce como cigoto a la estructura constituida por la fusión de los pronúcleos, los cuales forman el núcleo de la primera célula diploide. A partir de que el cigoto sufre la primera división y se forma una estructura con dos células, ya se le llama embrión, hasta que termine la organogénesis y adquiera las características fenotípicas propias de cada especie; a partir de este momento se le denomina feto (24 a 45 días). Las primeras divisiones embrionarias se caracterizan por un incremento en el número de células, las cuales contienen la mitad del citoplasma de las células que les dieron origen. Las células embrionarias, durante las primeras divisiones, se les llama blastómeros. En las primeras etapas del desarrollo embrionario, cada blastómero tiene la capacidad de desarrollar, en forma independiente, un embrión; por lo anterior, se dice que los blastómeros en estas fase son pluripotentes (Senger, 2003).

La mórula (16 células) es el estado embrionario en el cual las células se agrupan y se compactan; esta estructura continúa con su crecimiento hasta que se

transforma en un blastocisto, en el cual ya se pueden diferenciar dos grupos de células; uno de ellos (masa celular interna) a partir del cual se desarrollará el embrión y el otro del que se diferenciará la placenta (trofoblasto) (Senger, 2003). Hasta este momento el embrión todavía se encuentra rodeado por la zona pelúcida, la cual se pierde el día ocho. Después de la ruptura de la zona pelúcida (eclosión) el embrión experimentará un crecimiento acelerado y la relación madre-embrión será más compleja y dinámica. El tiempo de transporte del embrión, a través del oviducto, es de tres a cuatro días. (Senger, 2003).

Reconocimiento materno de la gestación y placentación

El endometrio produce $PGF2\alpha$ entre los días 17 y 19 del ciclo estral y ocurre la luteólisis. El establecimiento de la gestación depende de que el embrión suprima la secreción de la $PGF2\alpha$, lo cual logra mediante la secreción del $INTT$.

Durante la gestación la progesterona es imprescindible para el desarrollo embrionario ya que es responsable de regular la función de las glándulas uterinas encargadas de la secreción de sustancias que nutren al embrión. También, esta hormona inhibe la respuesta inmune del útero, lo cual evita que el embrión sea rechazado, ya que es reconocido como tejido ajeno; además, evita las contracciones uterinas. Otras hormonas esteroideas que están presentes durante la gestación son los estrógenos; producidas en la placenta. Los estrógenos aumentan en forma significativa al final de la gestación y su función principal consiste en el desarrollo mamario y en el mecanismo del parto (Senger, 2003).

En las primeras fases del desarrollo embrionario, el embrión se mantiene gracias a los nutrimentos aportados por las secreciones del oviducto y del útero. Durante este periodo, el embrión vive suspendido en la leche uterina y se puede mover

con relativa libertad en el lumen del cuerno uterino, del lado donde ocurrió la ovulación. Entre los días 17 y 18 el embrión se adhiere al endometrio.

Después de la eclosión del embrión, el trofoblasto comienza a crecer aceleradamente. El trofoblasto da origen al corion, el cual posee vellosidades, las cuales se fijan al endometrio, para el intercambio de sustancias que nutren al embrión.

Aproximadamente de la tercera semana después de la fertilización, se desarrolla el alantoides. Esta membrana comienza como un pequeño saco el cual rápidamente se expande y entra en contacto con el corion. El corion y el alantoides se fusionan formando la membrana corioalantoidea, la cual rápidamente se vasculariza constituyendo un complejo sistema sanguíneo entre el feto y la madre. El amnios se forma a partir del corion, esta membrana envuelve al embrión formando la vesícula amniótica, el cual se llena de líquido amniótico. El amnios forma un compartimiento en el cual el embrión o feto se desarrolla y además provee una barrera que protege al embrión contra agresiones físicas. También es el medio en el que se depositan sustancias de desecho de origen fetal.

En la vaca, la placenta es clasificada como cotiledonaria. El endometrio tiene áreas especializadas llamadas carúnculas y sirven para que se fijan las vellosidades coriónicas y se establezca el intercambio materno-fetal. La unión de los cotiledones y de las carúnculas constituye la unidad funcional conocida como placentoma (Galina y Valencia, 2008).

2.3 Mecanismo del aborto (Estrés fetal)

La hipoxia fetal puede presentarse por varios acontecimientos como: placentitis infecciosa, disfunción en la circulación materna, neumonías que interfieren con la transferencia del oxígeno, compresión del cordón umbilical, parto distócico, entre otras.

Cualquier alteración que produzca hipoxia fetal desencadena estrés en el mismo feto, como consecuencia aumenta la hormona adrenocorticotrópica fetal (ACTH) de la glándula pituitaria del feto. La ACTH actúa sobre la glándula adrenal del feto, aumentando la concentración de cortisol del feto (Osburn y Kennedy, 1981). Estos corticoides estimulan la producción de prostaglandinas $PGF_{2\alpha}$, en el útero de la madre, produciendo la lisis del cuerpo lúteo, disminuyendo los niveles de progesterona en la circulación materna, también estimulan la contracción del miometrio y a su vez activa receptores para la oxitocina, que llevara a la expulsión del feto (Osburn y Kennedy, 1981). En el feto la hipoxia estimula una redistribución de sanguínea hacia los órganos más vitales (cerebro) y la oxigenación se ve disminuida en los órganos menos vitales como el intestino. En el intestino esto ocasiona una vasoconstricción, aumento del peristaltismo y la consecuente liberación del meconio a la cavidad amniótica, tiñendo las superficies más expuestas. En esta etapa, el feto se encuentra en un estado de “estrés compensatorio” con buenos niveles de oxigenación en los órganos vitales e hipoxia periférica. Si la hipoxia continúa, el feto comienza a tener movimientos respiratorios violentos y espasmódicos que lo hacen inhalar líquido amniótico hacia los pulmones, resultando este proceso en la presencia de meconio en bronquiolos y alvéolos y eventualmente bronconeumonía incompatible con la vida extrauterina (Miller y col., 1982).

A continuación, se describen brevemente las enfermedades infecciosas causantes de aborto bovino en México y en el mundo, consideradas de gran importancia ya sea por su impacto económico, por ser enfermedades zoonóticas o por limitar el comercio internacional de animales o productos de origen animal.

2.4 Diarrea Viral Bovina

La Diarrea Viral Bovina (DVB) es una de las enfermedades infecciosas virales más prevalentes del ganado en México y en el mundo (Escamilla y col., 2007; Segura-Correa y col., 2010). Es ocasionada por un virus miembro del género Pestivirus, de la familia *Flaviviridae*.

2.4.1 Características

El virión es esférico de 50 nm, y consiste de lípidos estrechamente adheridos a la cubierta con indistinguibles espículas rodeando la nucleocapside. Contienen una molécula lineal de RNA, de aproximadamente 11 Kb. Su maduración y replicación ocurre en el citoplasma de la célula infectada.

2.4.2 Clasificación

El virus de la diarrea viral bovina (DVB) se presenta como dos biotipos: citopático (Cp) y no citopático (Ncp), basado en su desarrollo en cultivo celular y en al menos dos genotipos con 4 subgenotipos: DVB1a, DVB1b y DVB2a y DVB2 basado en la secuencia neogénica (Fulton, 2015). Esta enfermedad provoca pérdidas financieras a partir de una variedad de manifestaciones clínicas y es objeto de una serie de planes de mitigación y erradicación de todo el mundo. La forma de presentación de la infección por el DVB está condicionada por los

siguientes factores: viremia transitoria o persistente, capacidad del agente de comprometer al sistema inmune, ocurrencia de infecciones transplacentarias, inducción de inmunotolerancia y emergencia de inmunocompetencia fetal alrededor de los 180 días de gestación. Si los animales se infectan en vida posnatal, pueden cursar con fiebre, diarrea transitoria y recuperarse, sin embargo, el DVB puede provocar inmunosupresión, favoreciendo el desarrollo de neumonías al facilitar la colonización de bacterias u otros agentes virales como el BHV-1. Por otro lado, si la vaca se infecta en etapa temprana de la gestación, puede provocar el aborto. Las manifestaciones clínicas en caso de infección fetal (vía placenta) además del aborto, dependen de la etapa de gestación en que los productos se infecten lo que puede conducir a la muerte embrionaria, efectos teratogénicos o el nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI). Los animales PI eliminan el virus de la DVB en sus excreciones y secreciones durante toda la vida y son la principal vía de transmisión del virus, además si estos animales en vida posnatal sufren de superinfección con un biotipo citopático, pueden desarrollar la presentación clínica llamada enfermedad de las mucosas con lesiones ulcerativas en todo el tracto gastrointestinal, diarrea y muerte (Brodersen, 2014; Lanvon y col., 2014). Esta enfermedad también se encuentra incluida en la lista de enfermedades transmisibles e infecciones de los bovinos de la OIE (Lista OIE).

2.4.3 Patogenia

El biotipo Ncp puede ser transmitido por un amplio rango de fluidos corporales (descarga nasal, orina, leche, saliva, ovocitos de hembras PI, fluidos fetales y en el caso particular del semen puede sobrevivir 2.75 años), en las heces también

existe la presencia del virus, pero en menor cantidad y el tiempo de sobrevivencia es menor, aparentemente puede ser el causante de la infección aguda. El biotipo Cp puede producir una infección aguda en condiciones experimentales (Lanyon y col., 2010). Individuos PI que se dan por la infección del Biotipo Ncp, son la fuente más importante de diseminación, ya que el contacto nariz con nariz o contacto sexual con ellos son fuente de infección. También los fómites y moscas pueden transmitir la enfermedad. Los PI pueden desarrollar la enfermedad de las mucosas, por mutaciones en el virus RNA, ya que su molécula es inestable y puede convertirse en biotipo Cp.

Infecciones agudas: Una infección por biotipo Ncp en ganado no gestante resulta en una viremia que comienza 3 días post-infección. El desarrollo de anticuerpos contra el virus tarda 2 semanas. Los CD46 son los receptores en la membrana de macrófagos y linfocitos que ayudan a la entrada del virus a la célula. Induce la apoptosis de linfocitos B y T, y de los macrófagos mediante la activación de la caspasa 9. La viremia tiene una duración entre 10-14 días. Algunos signos que pueden observarse son linfopenia, trombocitopenia, apoptosis del timo y de tejido linfoide asociado a mucosas en intestino, pirexia y diarrea, resultado en una inmunosupresión que permite el establecimiento de otros agentes oportunistas “Enfermedad Respiratoria Bovina” y en caso del aborto bovino con *Neospora caninum*. La infección aguda puede resolverse completamente 3 semanas después en algunos casos. Sin embargo, pueden seguir transportando el virus en sangre durante 98 días o más.

El daño reproductivo por el virus de la Diarrea Viral Bovina puede ser de forma diversa y está estrechamente relacionada con el tiempo en que ocurra la infección durante la gestación, por ejemplo, en el primer trimestre se puede dar

el aborto, reabsorción o momificación fetal; después del día 30 de gestación puede resultar en el nacimiento de individuos PI entre 100 y 150 días se puede observar efectos teratógenos (hipoplasia cerebelar).

2.4.4 Diagnóstico

2.4.4.1 Aislamiento viral

El virus puede aislarse en monocapas de algunos cultivos celulares bovinos como riñón (MDBK), riñón bovino fetal (FBK), pulmón, testículos o cornetes. El crecimiento de ambos biotipos es generalmente satisfactorio. Es específico y altamente sensible. (OIE, 2008). Los biotipos CP inducen apoptosis en las células, es decir el núcleo presenta cariorrexis, apoptosis y cariólisis, de forma contraria no se observa en los biotipos NCP (Gamlen y col., 2010).

2.4.4.2 Histopatología

Las infecciones entre los 80-150 días de gestación pueden inducir efectos teratógenos como degeneración de la retina e hipoplasia cerebelar. Algunas de las lesiones que se han observado en fetos infectados, en sistema nervioso central son: microcefalia, pseudoquistes en el cerebro y timo, hipoplasia cerebelar donde las células de Purkinje están disminuidas en número, hidrancia, hidrocefalia, deficiente mielinización, microftalmia, hipoplasia pulmonar, braquignatia. También, puede encontrarse infiltrado mononuclear perivascular en el parénquima neural de cerebro y cerebelo o meninges. Alteraciones espongiiformes en la sustancia blanca, necrosis licuefactiva, en cerebro y médula espinal. Atrofia retiniana, atrofia de la corteza del timo,

miocarditis, hiperplasia linfoide peri bronquial y dermatitis perivascular son otros cambios observados mediante la histopatología (Schalafer y col., 2016).

2.4.4.3 Serología

Para la identificación de anticuerpos circulantes deben tenerse en consideración que individuos que hayan tenido una infección aguda serán positivos para el anticuerpo. Los persistentemente infectados serán negativos para anticuerpos. (Lanyon y col., 2014). La viremia en individuos no gestantes y no inmunes se presenta a los tres días post-infección, sin embargo, la inmunidad contra este agente suele desarrollarse dos semanas después de la infección.

2.4.4.4 PCR-RT

El RNA viral se puede identificar por medio de la técnica de PCR y su variante Retro-transcriptasa. Las muestras que se emplean son órganos de fetos, y frecuentemente pulmón de vacas adultas con Complejo Respiratorio Bovino.

2.4.4.5 Inmunohistoquímica

La identificación de este agente también se puede realizar por técnicas de inmunohistoquímica. En becerros se ha observado positividad al antígeno en hígado, en los sinusoides hepáticos, células de Kuffer, cercano a la vena central de hígado y en los vasos sanguíneos de cerebro (Lieber y col., 1997).

2.5 Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR)

La IBR es una enfermedad altamente contagiosa del ganado y algunos rumiantes de vida libre, causada por *Herpesvirus bovinum-1*.

2.5.1 Características

Este virus se encuentra envuelto en lípidos, tiene estructura poligonal vacía, y la nucleocápside contiene ADN de doble hebra, 140 pares de kpb, la nucleocápside contiene 162 capsómeros, 150 hexámeros y 12 tentameros. Los capsómeros son poligonales y en la sección cruzada; cada uno tiene aproximadamente 12 nm de longitud, 11.5 nm de ancho, con un agujero axial 2.5 nm. El DNA está envuelto alrededor de un núcleo fibroso con forma de cuchara, cuyas fibras están ancladas al lado interior de la cápside que lo rodea. El virión es pleomórfico, con un diámetro que varía de 120-200 nm, este contiene alrededor de 70 proteínas, de las cuales 11 son glicoproteínas de envoltura. Uno de los peplómeros de glicoproteínas, gI y gE posee el receptor Fc, y se une con la molécula IgG. Hay un solo tipo antigénico sin importar si el aislado fue de casos de IBR o Vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV). (Nandi S. y col., 2009)

La replicación ocurre en el núcleo con una transcripción secuencial y traducción temprana de proteínas α , β y γ . Su genoma viral codifica para 70 proteínas de las cuales 33 son proteínas estructurales y 15 son proteínas no estructurales.

Los viriones contienen más de 30 proteínas estructurales, seis están presentes en la nucleocápside, dos están asociadas al DNA. Las glicoproteínas tienen 12 y están localizados en la envoltura (James y col., 2011).

2.5.2 Clasificación

La Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) es causada por el herpes virus bovino 1 (BHV-1), miembro del género *Varicellovirus* de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, la cual pertenece a la familia *Herpesviridae*. Con base en los patrones de enzimas de digestión, hay tres genotipos. BHV-1.1 asociado a

enfermedad respiratoria, BHV-1.2 asociado a enfermedad genital que se divide en BHV-1.2a y BHV-1.2b, y también está el BHV-1.3 o BHV-5 causante de encefalitis. BHV-1 y BHV-1.2a causan la forma respiratoria de la enfermedad, con fiebre, caída de la producción de leche y aborto. Los aislados de BHV-1.2 causan aborto, BHV-1.2b no son abortivos. BHV-1.1 es más virulento que los otros subtipos. (Nandi S. y col., 2009) La enfermedad se encuentra distribuida en diversos países incluyendo a México (Martell y col., 1974; Escamilla y col., 2007; Segura-Correa y col., 2010). BHV-1 se asocia principalmente a varios cuadros clínicos denominados Rinotraqueitis, vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), aborto, conjuntivitis e infección generalizada. El IBR y la IPV se consideran dentro de las principales causas de aborto e infertilidad de origen viral en el ganado. Además el BHV-1 es uno de los principales agentes involucrados en el desarrollo de problemas respiratorios junto con otros agentes virales y bacterianos y el subtipo BHV-5 causa encefalitis (Jones y Chowdhury, 2007; Nandi y col., 2009). La enfermedad se encuentra incluida en la lista de enfermedades transmisibles e infecciones de los bovinos de la OIE debido a su importancia socio-económica en los países, ya que limita el comercio internacional de animales o productos de origen animal (Lista OIE).

2.5.3 Propiedades Fisicoquímicas

El virus de IBR-I es resistente a la influencia ambiental, la inactivación del virus en el ambiente depende de factores como temperatura, pH, luz, humedad y el tipo de medio que alberga al virus. A 4° centígrados el virus es estable por un mes, es inactivado a 56 ° en 21 min, a 37° en diez días, y a 22 dentro de 50 días. Este podría sobrevivir en el alimento debido a que la composición de su envoltura, es sensible a solventes orgánicos como cloroformo, éter o acetona, es fácilmente

inactivado usando sosa (hidróxido de sodio) al 0.5%, cloruro de mercurio 0.01%, cal clorinada 1%, derivados fenólicos 1% y bases de cuaternario de amonio 1% (Mahajan y col., 2013)

2.5.4 Patogenia

La infección con el HVB-1 es transmitida por contacto directo con los animales que eliminan el virus mediante las secreciones respiratorias o genitales y los fetos abortados. La viremia puede darse por reactivación del virus en latencia, como se ha observado en la vacunación usando virus vivo o modificado durante la gestación (Mahajan y col.,2013).

El virus en un inicio se replica en las células epiteliales del sitio inicialmente infectado. Se disemina por vía sistémica, es en esta forma donde se produce el aborto (viremia) ya que atraviesa la barrera placentaria y llega al feto produciendo daño y aborto. La respuesta a la infección del hospedador puede dividirse en una respuesta específica mediada por células B y T, y una respuesta no específica, mediada por neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales (NK), interferón y factores del complemento que pueden limitar la adhesión del virus al epitelio. El interferón α y β están presentes dentro de las 5 horas post-infección, y alcanzan niveles pico en secreciones nasales y sangre entre las 36 y 72 horas post-infección, y permanecen elevados hasta que la replicación del virus cesa. El Interferón α influencia la llegada de los linfocitos CD8 desde la sangre al pulmón donde estos pueden estar involucrados en la producción de citocinas tardías que disparan a los macrófagos a matar a las células infectadas por virus y en citotoxicidad de las propias CD8.

En la presentación respiratoria clásica el aborto es una consecuencia de la infección por BHV-1 en una vaca seronegativa, siguiendo la viremia el virus atraviesa la barrera materno-fetal produciendo una infección letal en el feto. La ruta por la cual llega al feto es desconocida, pero ya que las lesiones se observan en el hígado del feto, se sugiere una diseminación hematológica, probablemente vía umbilical. Aunque las lesiones pueden ser observadas en placenta y órganos fetales, se ha sugerido que la degeneración de la placenta podría ser secundaria a la muerte fetal inducida por el virus.

Latencia: el virus puede volverse latente seguido a la infección primaria con una cepa de campo, o vacunación con cepa atenuada. Se cree que la latencia se desarrolla en casi todos los animales, que son infectados con dosis altas o bajas, de virus atenuado o virulento. El ADN genómico viral es detectable en ganglios sensorios del nervio trigémino en IBR y en ganglio espinal sacro en IPV. La latencia también puede ocurrir en células linfoides tonsilares y linfocitos de sangre periférica. El transporte de ganado con infección latente y administración de cortico esteroides puede reactivar el virus resultado en la re-excreción del virus e incremento de los anticuerpos neutralizantes. La cepa de vacuna atenuada puede dejar en estado latente a los individuos y no protege contra las cepas de campo.

Los anticuerpos BHV-1 no previenen la replicación inicial del virus en los becerros y la latencia puede persistir después de la disminución de la inmunidad calostrada y los becerros ser seronegativos. El virus latente solo produce proteínas relacionadas a este virus.

2.5.5 Diagnóstico

2.5.5.1 Aislamiento viral

El virus crece rápidamente en cultivos celulares como Madine-Darby riñón bovino (MBDK), provenientes del hospedador natural, la observación de los efectos citopáticos se hace mediante microscopio invertido. Los cambios celulares que se puede evidenciar es el acomodo de células redondas en forma de uva en mono capa.

2.5.5.2 Serología

La serología se usa de forma frecuente para la detección de anticuerpos Herpesvirus tipo I, en el suero de los animales, como son la seroneutralización y ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). La ELISA se usa de forma extensa por ser rápida y empleada en un gran número de muestras. La seropositividad puede presentarse por exposición al virus, enfermedades o reactivación del virus en latencia. Esta prueba ofrece un panorama general del hato.

2.5.5.3 Histopatología

El aborto ocurre entre los 4 y 8 meses de gestación (Mahajan y col., 2013), las lesiones que pueden encontrarse en el feto son focos de necrosis con mínimo infiltrado inflamatorio, esta lesión se puede encontrar en órganos como hígado, glándula adrenal, riñón, intestino, linfonodos, pulmón y bazo. En la glándula adrenal e hígado, se pueden observar cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos. (Schalafer y col., 2016).

2.5.5.4 PCR

La identificación del DNA viral puede hacerse a través de líquidos corporales en vacas infectadas, fluidos fetales, órganos fetales y placenta.

2.6 Brucelosis

La Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano y curso crónico en bovinos. *Brucella abortus* es el principal agente causal de Brucelosis en el ganado lechero. Las pérdidas de productividad causadas por esta enfermedad pueden tener gran importancia, principalmente, debido a descenso en la producción de leche a causa de los abortos de las vacas. La infertilidad como secuela, frecuentemente aumenta el período entre la lactancia, y en un rebaño infectado el promedio entre los partos puede prolongarse durante varios meses. Además de la pérdida de producción de leche, existen también pérdidas de terneros e interferencias con los planes de crianza. La Brucelosis bovina es una enfermedad zoonótica endémica en México, Latinoamérica, Medio Oriente, África y Asia, por lo que se han realizado grandes esfuerzos para su control y erradicación (Corbel y col., 2006; Ávila y Cruz, 2007; Escamilla y col. 2007; Dorneles y col. 2015; Méndez-Lozano y col., 2015). La enfermedad es de declaración obligatoria y se encuentra incluida en la lista de enfermedades, infecciones e infestaciones comunes a varias especies animales de la OIE (Lista OIE).

2.6.1 Características del agente

El género *Brucella*, está constituido por cocobacilos Gram negativos que miden 0.6-1.5 μm x 0.5-0.7 μm , no encapsulados, inmóviles y aerobios estrictos y de crecimiento lento, tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivos, no atacan la gelatina ni modifican la leche y en general no fermentan los azúcares

Estructura externa: La membrana externa de *Brucella* es rica en fosfatidilcolina. Su componente más abundante es el lipopolisacárido (LPS), que se conoce también con el nombre de endotoxina y posee tres regiones: el lípido A (glicolípido que contiene glucosamina y diaminoglucosa) inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido intermedio llamado núcleo compuesto por glucosa, manosa y ácido 3 deoxi-D-mano-2 octulosónico (KDO), y el polisacárido O (PSO), también conocido como cadena O. El PSO es la porción más distal del LPS y está compuesto por residuos de N-formil perosamina. Las brucellas contienen otro polisacárido denominado hapteno nativo (HN), que es químicamente idéntico a la cadena O pero no está unido al núcleo. El LPS-colonias lisas de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-colonias rugosas de las formas rugosas carece de cadena O está reducida a muy pocos residuos. (Castro y col., 2005)

Estructura interna: Las proteínas citoplasmáticas a pesar de ser únicas de este género son compartidas por todas las especies. Algunas de estas proteínas se han empleado para la ayuda en el diagnóstico como la glicoproteína A2 termorresistente, otra proteína de 17 KDa involucrada en la síntesis de riboflavina que se expresa en la fase activa de la infección.

Su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y no posee plásmidos. Su ADN contiene entre un 58-59% de guanina y citocina, el tamaño de su genoma es aproximadamente entre $2,5 \times 10^6$ pares de bases (Allardent-Servent y col., 1988). Se estima que el 8% de su genoma codifica para funciones de sobrevivencia y virulencia (Hong y col, 2000).

2.6.2 Clasificación

El género *Brucella* incluye seis especies: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. maris*. Las primeras cuatro son zoonosis.

Otro tipo de clasificación se basa en su aspecto cuando crecen en medios sólidos las hay lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las lisas están *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* y las rugosas *B. ovis* y *B. canis*. Este aspecto es debido a la expresión del lipopolisacárido (LPS) en la superficie bacteriana, sin embargo, su crecimiento en los medios de cultivo pueden experimentar mutaciones que afectan la expresión del LPS. Las cepas en fase lisa son consideradas como las más virulentas debido a que su ultraestructura es semejante a algunas entero bacterias. (Castro y col., 2005).

Brucella abortus, tiene siete biovariedades reconocidas, de las cuales 1, 2, 3, 4 y 9 son las más reportadas. La biovariedad tipo 1 es la más frecuente en América Latina (Díaz, 2013). *B. abortus*, además de infectar al ganado bovino, puede infectar a otras especies como búfalos, bisontes, alces, jabalíes, zorros, renos, camellos y animales marinos.

2.6.3 Patogenia

La infección ocurre a través de la mucosa oronasal, por ingesta de alimentos contaminados como la leche o calostro en becerros, por inhalación de polvo contaminado de establos de animales infectados con la bacteria y por exposición con exudados vaginales después del aborto (Rodríguez y col., 2001).

Después del ingreso de la bacteria, esta es fagocitada por macrófagos y transportada a los linfonodos regionales más próximos al sitio de entrada. La bacteria puede ser destruida o sobrevivir por tiempos largos en las células fagocíticas. La bacteria se encuentra en el fagosoma, e inhibe la unión fagosoma-

lisosoma mediante la acidificación rápida del medio. En células fagocíticas no especializadas, la internalización de *B. abortus* se asocia al dominio extracelular de la proteína tirosina quinasa.

Si la bacteria no es destruida, se origina una bacteriemia y de esta forma se dispersa hacia otros linfonodos, como los cercanos a la ubre y el útero. La bacteria tiene una marcada predilección por el trofoblasto placentario donde se replica y se acumula en gran número provocando una placentitis crónica, ya que tiene afinidad por un factor de crecimiento conocido como eritritol. Esto puede desencadenar el aborto que con frecuencia ocurre en el último tercio de la gestación. Las vacas que abortan por esta causa eliminan millones de bacterias al medio ambiente mediante el feto, la placenta, los fluidos fetales, loquios y flujo vaginal.

Los becerros que no son abortados pueden contraer la infección al pasar por el canal uterino o al tener contacto con los fluidos de loquios o vaginales, o mamar calostros de vacas infectadas, algunos pueden eliminar la infección, pero otros permanecen infectados y en estudios serológicos suelen ser negativos, y es hasta en etapa adulta que se desencadena la infección y puede conducir al aborto (Díaz, 2013).

El aborto se presenta comúnmente en la primera gestación, y el 80% de las vacas con la enfermedad solo abortan una vez, pero esto no significa que no tengan la infección, a pesar de no presentar más abortos, siguen eliminando la bacteria por la leche, fluidos fetales, fluidos vaginales y placenta (Díaz, 2013).

2.6.4 Diagnóstico

2.6.4.1 Aislamiento

En los abortos pueden tomarse muestras para aislamiento bacteriológico de las membranas y líquidos fetales como el contenido abomasal.

Las bacterias crecen en condiciones de aerobiosis y en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno. Algunas brucellas crecen lentamente y necesitan entre 5-7 días y otras hasta 14 días. Los cultivos no deben ser considerados negativos hasta después de 21 días de incubación. Su temperatura óptima de incubación es de 37°C, pH 6.8-7.2 en hemocultivos que contengan caldo triptosa y un medio sólido (agar triptosa). También se menciona que los medios enriquecidos con suero de equino o de bovinos seronegativos a la infección contribuyen a su crecimiento. (Freer y Castro 2001).

2.6.4.2 Prueba de rosa de Bengala

La prueba es empleada como prueba diagnóstica oficial en México, tiene una sensibilidad del 94% y una especificidad del 100%. La prueba se fundamenta en la inhibición de algunas aglutininas a pH bajo. Esta prueba detecta IgG e IgM. Los anticuerpos tienen la capacidad de unirse a dos antígenos y estos a su vez de unen a varios anticuerpos, formando una malla entrelazada observable directamente. La mayoría de las pruebas emplean como antígenos suspensiones de *Brucella* en fase S o R, según la cepa bacteriana. Las cepas recomendadas por los organismos internacionales en la elaboración de los mismos son *B. abortus* 1119-3 ó 99S.

2.6.4.3 RIVANOL

Esta prueba fue desarrollada por Anderson en 1964. Se realiza de los sueros de animales positivos a la prueba de tarjeta, con la finalidad de diferenciar una

respuesta posvacunal de una respuesta de tipo infecciosa. El rivanol es un colorante de acridina que tiene la capacidad de sedimentar las proteínas del suero, entre ellas a los anticuerpos de IgM, que predominan en el curso de la vacunación. Se emplea RIVANOL al 1 %.

La prueba de Rosa de Bengala al 8%, como una prueba tamiz y la prueba de Rivanol permite distinguir entre animales infectados de los animales vacunados con la cepa lisa de *B. abortus* S 19; cabe mencionar que los animales vacunados con la cepa rugosa de *B. abortus* RB51 no son detectados por esta prueba.

2.6.4.4 ELISA

Es una técnica sensible y específica, la cantidad de suero requerida es poca. Es una prueba rápida por la que un anticuerpo o antígeno se une a una enzima como medio para detectar una relación entre el anticuerpo y antígeno. Durante la fase aguda de la infección hay un incremento de IgM e IgG, pero conforme avanza la infección los títulos de IgM disminuyen y pueden ser detectados hasta 8 o 10 meses después.

2.6.4.5 Histopatología

Las lesiones histológicas que se observan en fetos abortados son; neumonía, bronquitis o bronconeumonía por células mononucleares en su mayoría, aunque también pueden observarse neutrófilos, fibrina y hemorragia en la pleura. Otras lesiones son arteritis necrotizante principalmente en los vasos sanguíneos del pulmón, también diferentes grados de necrosis en riñón, hígado, bazo y linfonodos (Schalafer y col., 2016).

2.6.4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica ha sido útil y específica en la detección de DNA bacteriano de *Brucella abortus*, se pueden emplear muestras como órganos de feto bovino, sangre y leche.

2.7 Leptospirosis

La Leptospirosis es una enfermedad de epidemiología compleja, producida por bacterias del género *Leptospira*. Inicialmente el género *Leptospira* se clasificó en *L. interrogans* que incluye a las especies patógenas y en *L. biflexa* que incluye a las especies saprófitas (Kmety y Dikken, 1993), sin embargo, en la reunión de 2007 del Subcomité de Taxonomía de Leptospiraceae celebrada en Quito, Ecuador, se decidió otorgar el estatus de especie a las genomospecies 1, 3, 4 y 5 previamente descritas, lo que resulta en una familia que comprende 13 especies de Leptospiras patógenas: *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomospecies 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomospecies 3), *L. weilii*, *L. wolffii*, con más de 260 serotipos. Existen nuevas especies adicionales saprófitas de *Leptospira* que incluyen: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae* (genomospecies 5), *L. kmetyi*, *L. vanthielii* (genomospecies 4) y *L. wolbachii*, y contienen más de 60 serovares. La clasificación de serovariedades se basa en la expresión de los epítomos expuestos en la superficie en un mosaico del antígeno del lipopolisacárido (LPS), mientras que la especificidad de los epítomos dependen de su composición y orientación del azúcar (Ben y De la Peña, 2010). Se ha visto que *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo y *L. interrogans* serovariedad Pomona, son las serovariedades más patógenas en el ganado bovino en Norte

América (Wynwood y col., 2016). En México, existen escasos estudios en dónde se ha informado positividad en bovinos para las serovariedades *Hardjo*, *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Bratislava* (Luna y col. 2005; Chávez, 2006). En el ganado bovino puede cursar con diferentes cuadros clínicos, desde un cuadro agudo o hiperagudo con fiebre, hematuria, hemoglobinuria, meningitis e incluso mortalidad, a un cuadro crónico cuyo único signo clínico es el aborto o el nacimiento de animales prematuros y débiles. La enfermedad en el ganado bovino tiene un gran impacto económico por afectar la reproducción, además de tener un potencial zoonótico (Carmona-Gasca y col., 2011).

2.7.1 Características del agente

Las leptospiras son espiroquetas que miden de 0.1 a 6 μm de ancho y hasta 20 μm de largo, son aerobias obligadas y tienen una composición similar a la de otras bacterias Gram negativas, pero su actividad endotóxica es menor. Están formadas por una cubierta externa, dos filamentos axiales y un cilindro citoplasmático que está cubierto por una membrana celular y por la capa de peptidoglicano de la pared celular. En la pared celular se encuentra una endotoxina, una hemolisina y una esfingomielinasas C que está relacionada con algunos serotipos. El genoma de las leptospiras tiene un tamaño aproximado de 5,000 kb, con dos cromosomas uno de 4,400 kb y otro pequeño de 350 kb. (Alonso-Andicoberry y col., 2001)

2.7.2 Patogenia

La enfermedad se puede transmitir por contacto con orina infectada, descargas uterinas post-aborto, placenta, o fómites. La vía de entrada es por mucosas intactas o lesiones en piel se desencadenan una leptospiremia. El aborto se produce porque en la fase de leptospiremia las bacterias atraviesan la placenta y llegan al feto causando su muerte (Alonso-Andicoberry y col., 2001).

2.7.3 Diagnóstico

2.7.3.1 Aislamiento

Son microorganismos que crecen en medios aerobios estrictos entre 29-30 °C, su tiempo de crecimiento es de unas 12 horas. Crece en medios líquidos o semilíquidos, enriquecidos con suero de conejo o albumina bovina. Son oxidasa y catalasa positiva, tienen actividad lipásica, algunas producen ureasa.

2.7.3.2 Técnica de aglutinación microscópica (MAT)

Esta técnica identifica la serovariedad específica y se utiliza para la serotipificación. La OIE considera seropositividad en la dilución 1:100 o superior que puede indicar infección activa y los títulos vacúnales son inferiores a 1:50 (OIE, 1992).

Algunos autores han determinado la sensibilidad de esta prueba en un rango de 40-89.2% y su rango de especificidad de 85.97-100% (Effler y col., 2002. Pradutkanchana y col., 2003)

2.7.3.3 ELISA

Esta prueba detecta anticuerpos en suero y en leche. Su desventaja es que no permite diferenciar entre anticuerpos vacúnales o por infección.

2.7.3.4 Histopatología

El aborto se produce en el último tercio de la gestación, las lesiones histológicas que suelen encontrarse en fetos abortados son múltiples focos de necrosis en epitelio tubular renal, nefritis intersticial por células plasmáticas en su mayoría y raramente puede observarse meningitis no supurativa y neumonía. (Schalafer y col., 2016).

2.7.3.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La identificación del DNA bacteriano se ha realizado a partir de órganos y líquido gástrico en fetos (Otaka y col., 2012), placenta, sangre, órganos y orina en bovinos adultos.

2.8 Neosporosis

La Neosporosis bovina es causada por *Neospora caninum*, protozooario intracelular obligado de distribución mundial que afecta a cualquier tipo de ganado y a cualquier edad, aunque ha tenido mayor impacto económico en el ganado lechero. La parasitosis en el ganado se caracteriza principalmente por provocar abortos, el nacimiento de becerros clínicamente sanos pero persistentemente infectados o el nacimiento de becerros débiles y con signos clínicos nerviosos (Dubey y col., 2006; Dubey y Schares, 2007, 2011). La principal vía de transmisión del parásito es la vertical, la cual puede ser por varias generaciones favoreciendo la permanencia de la infección en los hatos. Los abortos pueden ser endémicos (Hall y col., 2005) o epidémicos (tormenta de abortos), mayores al 12.5%, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas (Pfeiffer y col., 2002; Reichel y col., 2014). Al respecto, en un análisis económico realizado con información obtenida de 10 países con datos representativos de abortos asociados a *Neospora caninum* incluyendo a México, se estimaron

pérdidas anuales de 1 billón de dólares (US) en promedio, con un rango de hasta 2.4 billones de dólares (US) (Reichel y col., 2013). En este estudio se estiman pérdidas de más de 800 millones de dólares (US) anuales sólo en la industria lechera, representando un porcentaje de pérdidas del 40% mayor en éste tipo de ganado con respecto al ganado productor de carne. Con respecto a México, el promedio de las pérdidas económicas anuales debidas a la infección por *Neospora caninum* en ganado lechero se estiman en 68.5 millones de dólares (US) con un rango de 52.4 hasta 403.2 millones de dólares (US) (Reichel y col., 2013). El mayor número de datos epidemiológicos de Neosporosis bovina en México, se han obtenido mediante estudios serológicos (Morales y col., 2001; García y col., 2002, 2005; Salinas y col., 2005; García-Vázquez y col., 2009; Arreola-Camberos y col., 2012; Figueroa y col., 2012), sin embargo, también se cuenta con la evidencia de la presencia del parásito en los tejidos de los fetos abortados y vacas por estudios histopatológicos, inmunohistoquímicas y PCR (Morales y col., 2001; Medida y col., 2006; Santana y col., 2010; Silva y col., 2012; Orozco y col., 2013). Estos estudios indican que la Neosporosis bovina se encuentra ampliamente difundida en los hatos mexicanos.

2.8.1 Características

Neospora caninum es un protozooario que pertenece al *Phylum Apicomplexa*, estructuralmente es similar a *Toxoplasma gondii* pero no antigénicamente.

Dentro del ciclo de vida se reconocen tres estadios infecciosos: taquizoítos, quistes tisulares y ooquistes. Los taquizoítos y quistes tisulares son las fases intermedias presentes en los huéspedes intermediarios (Dubey *et al.*, 2002). Los taquizoítos pueden medir 6 por 2 μm . Los quistes en los tejidos suelen ser redondos u ovalados, de hasta 107 μm de diámetro, y se encuentra

principalmente en el sistema nervioso central. La pared del quiste tiene un espesor de hasta 4 μm , y los bradizoítos internos miden de 7 a 8 por 2 μm . Es un parásito que tiene un amplio rango de hospedadores intermediarios (rumiantes, equinos, animales silvestres) pero tiene mayor repercusión en el ganado bovino y perros por ser los hospederos definitivos. La forma de transmisión puede ser vertical o transplacentaria endógena por la cual se infecta el feto y horizontal por la ingestión de ooquistes excretados en las heces de los hospederos definitivos (canidos). Puede causar aborto o bien dirigir al nacimiento de becerros con una infección crónica (persistentemente infectados) o con signos neurológicos.

2.8.2 Diagnóstico

2.8.2.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

La IFI preserva la morfología del parásito y detecta antígenos de membrana no existiendo reacción cruzada con *Sarcocystis* spp.

2.8.2.2 Serología

La interpretación de un resultado serológico es difícil por la variación de los niveles de anticuerpos en hembras bovinas gestantes congénitamente infectadas tendiendo a incrementarse en el último trimestre de la gestación y decreciendo después del parto o aborto.

2.8.2.3 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Se utilizan antígenos solubles obtenidos por destrucción del parásito al sonicar o congelar y descongelar, taquizoítos fijados en formol para la detección de

anticuerpos en esta prueba. Observando mayor especificidad empelando antígenos con taquizoítos fijados en formol.

2.8.2.4 Inmunohistoquímica (IHQ)

La inmunohistoquímica (IHQ) es realizada sobre tejidos fetales que han sido fijados con formol previamente con lesiones histopatológicas compatibles, permite la identificación de neosporosis (bradizoítos y taquizoítos) con alta especificidad, adquiriendo valor diagnóstico relevante. Aunque su sensibilidad es baja, probablemente debido a los escasos parásitos presentes en tejidos autolizados.

2.8.2.5 Aislamiento

Se propone inicialmente, inocular tejido cerebral de feto bovino a ratones, con la finalidad de multiplicar y concentrar los taquizoítos aumentando las probabilidades de aislamiento. El aislamiento también ha sido posible a partir de riñón de fetos (Locatelli y col., 2018).

2.8.2.6 Histopatología

El aborto ocurre principalmente entre los 5 y 6 meses de gestación. En el feto se pueden encontrar los taquizoítos o quistes inmersos en focos de necrosis en cerebro, aunque puede ser difícil encontrarlos y visualizarlos con tinciones de rutina H y E. Los taquizoítos también se pueden encontrar intracelulares en cardiomiocitos, células musculares y fibras de Purkinje y focos de necrosis hepática. Otras lesiones que se pueden observar son nefritis intersticial no supurativa, neumonía intersticial, y adenitis de la glándula adrenal. En la madre

además del aborto puede ocasionar otros problemas reproductivos como repetición del estro o infertilidad. (Schalafer y col., 2016).

2.8.2.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica PCR ha permitido un gran avance en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas por ser extremadamente sensible y específica. En el diagnóstico de la Neosporosis bovina, su impacto ha sido notable permitiendo esclarecer ciertos aspectos epidemiológicos.

2.9 Otras enfermedades infecciosas abortivas

Existen otras enfermedades infecciosas que pueden producir aborto como la Salmonelosis, ocasionada por *Salmonella entérica*, serovariedad *Dublin* es el agente que con frecuencia se asocia al aborto bovino. Este agente puede llegar a infectar al feto por episodios de bacteriemia en la madre, el aborto se produce frecuentemente en el segundo tercio de la gestación, el feto puede presentar autólisis y enfisema y bronquitis supurativa. En casos de Listeriosis causada por *Listeria monocytogenes*, la infección se da por ingestión de ensilaje mal conservado en épocas de frío. El aborto se presenta principalmente en el tercer trimestre de la gestación y las lesiones que se pueden observar en los fetos son hepatitis necrótica y supurativa o émbolos bacterianos, también pueden observarse focos necróticos e inflamatorios parecidos en corazón, pulmón, riñón bazo y meningitis no supurativa. En casos de Ureaplasmosis causada por *Ureaplasma diversum*, el aborto se presenta comúnmente en el tercer tercio de la gestación, en el feto puede observarse alveolitis no supurativa e hiperplasia linfoide peribronquial. El aborto por hongos (micótico) ocurre generalmente en el

tercer trimestre de la gestación, y es ocasionado por *Aspergillus fumigatus*, *Mucor spp*, *Rhizopus spp.* o *Candida spp.* principalmente las lesiones que pueden encontrarse en el feto son placas elevadas circulares coalescentes en la piel, bronconeumonía y focos de inflamación en el tubo digestivo. Trichomoniasis causada por *Tritrichomonas foetus*, el aborto se presenta a partir de los dos meses de gestación. En el feto puede observarse bronconeumonía supurativa e histiocítica, aunque las lesiones no son específicas, los protozoarios pueden encontrarse en fluidos fetales y estómago. *Trueperella pyogenes* es otro agente que puede ocasionar aborto, en el feto puede observarse bronconeumonía fibrinosa, aunque también pueden observarse bacterias sin células inflamatorias. Por otro lado, aunque *Sarcocystis spp.* es un protozoario muy común del ganado, muy pocas veces se relaciona con aborto. En el cerebro y meninges del feto, se puede observar áreas de necrosis rodeadas de linfocitos, lesiones similares pueden observarse en músculo cardíaco, riñón, hígado y pulmón. (Schalafer y col., 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

En México no se cuenta con información de la presencia simultánea de agentes infecciosos involucrados en abortos de bovinos lecheros empleando técnicas diagnósticas como histopatología y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) aplicadas a los tejidos de los fetos, así como serología de las madres que presentaron el aborto.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar agentes infecciosos de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, Leptospirosis, Brucelosis y Neosporosis presentes simultáneamente en los fetos abortados de bovinos lecheros de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo, México.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Colectar fetos abortados de bovinos lecheros y realizar las necropsias
- Obtener muestras de corazón, pulmón, riñón, hígado y encéfalo para realizar el estudio histopatológico y detectar lesiones características de aborto por Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, Leptospirosis, Brucelosis y Neosporosis
- De estos mismos tejidos, realizar el estudio molecular utilizando la técnica de PCR y su variante PCR-RT para la identificación de los agentes responsables de estas enfermedades.
- Tomar muestras sanguíneas para la detección de anticuerpos contra estas enfermedades a las vacas que presentaron estos abortos.
- Correlacionar las lesiones microscópicas observadas en cada órgano, con los agentes detectados por PCR, PCR-RT y Serología.
- Correlacionar los resultados de PCR y PCR-RT con los resultados serológicos de las madres.
- Determinar la frecuencia de agentes infecciosos en el diagnóstico integral con los diferentes tercios de gestación en los que se presentaron los abortos.
- Para apoyar la discusión de los resultados, realizar una encuesta tomando en cuenta datos como: los días de gestación por diferencia de último servicio y fecha de aborto, además del calendario de vacunación

6. HIPÓTESIS

En los tejidos de los fetos de bovino se identificará a más de un agente infeccioso involucrado en los abortos.

Los agentes infecciosos identificados en los tejidos de los fetos abortados tendrán diferente afinidad de acuerdo a los diferentes tercios de gestación.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Lugar de estudio

La toma de muestras para este estudio, se llevó a cabo en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), ubicado en el municipio de Tizayuca al sur del estado de Hidalgo, México, a la altura del kilómetro 57 de la carretera México-Pachuca. El CAIT tiene una extensión de 220 has. Con 125 establos lecheros y su sistema de producción es de tipo intensiva estabulado. Se estima que cuenta con 5000 cabezas de ganado de raza Holstein-Friesian.

7.2 Material biológico

Se colectaron 20 fetos de bovino lechero que fueron abortados en cualquier trimestre de gestación y que no presentaron momificación ni maceración. Los fetos provinieron de los establos que solicitaron el servicio de necropsia. Se les realizó la inspección externa y la necropsia de acuerdo a la técnica descrita por S. de Aluja y Constantino (2002), dicho proceso se llevó a cabo en la sala de necropsias del Centro de Enseñanza y Diagnóstico de Enfermedades de Bovinos (CEDEB), UNAM.

7.3 Histopatología

Durante la necropsia, se tomaron muestras de pulmón, riñón, corazón, hígado y cerebro para estudio histopatológico, las cuales fueron fijadas en formalina al 10% por 48 horas y procesadas en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM en el laboratorio de histotecnología empleando la técnica histológica de rutina. La selección de estos órganos se hizo

con base a la afinidad en común que tienen estos cinco agentes por dichos órganos. Las muestras fueron deshidratadas en soluciones crecientes de alcoholes, diafanizadas en Xilol, incluidas en parafina, cortadas en micrótomos a un grosor de 4-7 μm , teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) y revisadas con microscopio de fotónico.

En la revisión de los órganos fetales se buscaron lesiones sugerentes o compatibles con agentes infecciosos bacterianos (Leptospirosis, Brucelosis), virales (DVB y Herpesvirus) o parasitarios (Neosporosis) así como inflamación, necrosis o la presencia de bacterias, protozoarios o inclusiones virales. Las lesiones se categorizaron en escala ordinal como leve, moderada y severa, además la distribución y tipo de lesión. La categorización de lesiones se realizó con base en la experiencia y revisión de patólogos del Departamento de Patología, FMVZ, UNAM.

Se emitió un diagnóstico presuntivo para cada feto donde de acuerdo a las lesiones observadas se categorizó en cada una de las enfermedades antes mencionadas.

7.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Durante las necropsias, se tomaron muestras de corazón, pulmón, riñón, hígado y encéfalo, que se conservaron a -70°C hasta su procesamiento por la técnica de PCR y su variante PCR-RT. Cada uno de los órganos de los fetos, se procesaron para la detección de los cinco agentes antes mencionados, realizándose un total de 500 PCR's.

7.4.1 Extracción de DNA y RNA

La obtención de DNA se realizó a través de tratamiento con fenol-cloroformo-isoamílico. El tejido se maceró con agua inyectable estéril (PISA) para una concentración de 20%. En un tubo eppendorf de 1.7 ml se adiciono 250µl de macerado, 250 µl de solución de lisis (apéndice 1) y 12.5 µl de proteínasa K (stock 20 mg/ml, para una concentración final de 1mg/ml, PROMEGA), se dejó incubar en baño maría a 36 °C durante dos horas. Se adiciono 1 volumen de fenol cloroformo Isoamilico (25:24:1), se agitó en vortex 5 segundos y centrifugó a 12500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se pasó a otro tubo eppendorf, se adiciono un volumen de cloroformo isoamilico (24:1) se agitó 5 segundos en vortex y centrifugó a 12500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se recuperó la parte acuosa y se pasó a otro tubo. Se adiciono 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se conservó a -20°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 12500 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó sobrenadante. Se adiciono 250µl de etanol al 70% frío, se centrifugó a 12500 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó sobrenadante. Se dejó secar la pastilla durante 1 hora a temperatura ambiente. Se disolvió la pastilla con 100µl de agua inyectable estéril y se calentó en termoblock a 55-60°C durante 10 minutos. Se conservó a -20°C. Para la extracción del RNA se empleó el método de Trizol. El tejido se maceró con agua inyectable estéril para una concentración de 20%. En un tubo eppendorf de 2 mL se adicionó 500 µl del macerado con 1000 µl de Trizol, se mezcló suave por inversión e incubó en hielo 10 minutos. Se adicionó 200 µl de cloroformo, se agitó en vortex 15 segundos e incubó en hielo 5 minutos. Se centrifugó en 12000 rpm, 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se agregó 1 volumen de isopropanol frío. Se conservó a -20°C por 30 minutos. Se

centrifugó a 12000 rpm, 15 minutos a 4°C. Se descartó sobrenadante y se secó la pastilla a temperatura ambiente por 1 hora. Se suspendió la pastilla en 30 µl de agua DEPC y se mantuvo congelada a -80°C hasta su utilización.

Se realizaron 100 extracciones de DNA y RNA de forma tradicional, el marcador de peso molecular es de 1Kb (Gene Ruler™ DNA Ladder).

7.4.2 Desarrollo de PCR para DVB

Se utilizaron los primers de una región UTR HCV-368 (forward) 5'CCATGTGCCATGTACAG3' y HCV-90 (reverse) 5'CATGCCCCATAGTAGGAC3' (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, Estados Unidos) que amplificaron un fragmento de ARN de 283 pb (Ridpath y col., 1994).

Par el desarrollo de PCR-RT, se utilizó una mezcla de 20 µl compuesto por: Buffer 2 µl (10X), DNTP's 2 µl (2mM), Iniciador 2 µl (10 µM), MgCl 0.6 µl (30 Mm), RT 80U (160U/ µl), Taq (Amplicasa 500U, Biotecmol) 2.5 U (5U/ µl), RNA 10 µl y agua destilada hasta completar el volumen final de la mezcla.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (TECHNE TC-412, AccesoLab) con un programa compuesto por 3 etapas: a) 42°C durante 30 min, 94 °C durante 2 min un ciclo b) desnaturalización (94°C durante 30 segundos), alineación (50°C durante 1 min); c) extensión (72°C durante 30 seg) y extensión final (72°C durante 5 min). Los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis 110 Volts, en un gel de agarosa al 3 %, teñido con bromuro de etidio y visualizados mediante luz ultravioleta en un transiluminador. Como control positivo se empleo la vacuna Bovi-Shield GOLD® FP® 5 VL5 - Zoetis. El liofilizado fue resuspendido en 5 mililitros de agua inyectable estéril.

7.4.3 Desarrollo de PCR para BHV-1

Se emplearon los primers gDF (forward) 5'AACATGCAAGGGCCGACATTGG3'' y gGR (reverse) 5'GACCGTGCCGTCGATGTACAGC3''(Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, Estados Unidos) que amplifican un segmento de 552 pb del gen de la glicoproteína D (Takiuchi y col., 2005, Alegre y col.,2001, Gogev y col., 2004)

Para el desarrollo de PCR, se utilizó una mezcla de 20 µl compuesto por: Buffer 2 µl (10X), DNTP's 2 µl (2mM), Iniciador 1 µl (10 µM), MgCl 0.66 µl (30 Mm), Taq (Amplicasa 500U, Biotecmol) 2.5 U (5U/ µl), DNA 3 µl y agua destilada hasta completar el volumen final de la mezcla.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (TECHNE TC-412, AccesoLab) con un programa de 30 ciclos compuesto por una desnaturalización inicial (94°C durante 5 min), desnaturalización (95°C durante 1 min), alineación (55°C durante 1min), extensión (72°C durante 2 min) y extensión final (72°C durante 7 min).

Finalmente, los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis a 100 volts en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio y visualizados mediante luz ultravioleta en un transiluminador.

Como control positivo se empleo la vacuna Bovi-Shield GOLD® FP® 5 VL5 - Zoetis, el liofilizado fue resuspendido en 5 mililitros de agua inyectable estéril.

7.4.4 Desarrollo de PCR para *Leptospira borgpetersenii* serovar *Hardjo*, *L. interrogans* serovar *Pomona*, *Leptospira kirschneri* serovar *Grippotyphosa*

Se utilizaron los primers LipL32-270F (5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT-3') y LipL32-692R (5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3'), que amplifican un fragmento de 423 pares de bases. Estas secuencias amplifican

una región conservada de *Leptospira borgpetersenii* serovar *Hardjo*, *L. interrogans* serovar *Pomona*, *Leptospira kirschneri* serovar *Grippotyphosa*.

Para el desarrollo de PCR, se utilizó una mezcla de 20 µl compuesto por: Buffer 2 µl (10X), DNTP's 2 µl (2mM), Iniciador 0.8 µl (10 µM), MgCl 1.33 µl (30 Mm), Taq (Amplicasa 500U, Biotecmol) 1.5 U (5U/ µl), DNA 3 µl y agua destilada hasta completar el volumen final de la mezcla.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (TECHNE TC-412, Acceso Lab), compuesto con un programa compuesto por desnaturalización inicial (94°C durante 3 min), desnaturalización (94°C durante 1 min) alineamiento (58°C durante 1) extensión (72°C durante 1 min) 35 ciclos y extensión final 72°C durante 7 minutos.

Finalmente, los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis a 100 volts en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio y visualizados mediante luz ultravioleta en un transiluminador.

Como control positivo se empleó el DNA proporcionado por el Doctor Daniel Atilano López, del Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ, UNAM, CDMX, México.

7.4.5 Desarrollo de PCR para *Brucella abortus*

Se utilizaron los primers IS 711 (forward) 5'TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT3' y All bru (reverse) 'GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC3' (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, Estados Unidos) que amplificará un fragmento de ADN de 498 bp (Bricker and Halling, 1994,1995).

Para el desarrollo de PCR, se utilizó una mezcla de 25 µl compuesto por: Buffer 2.5 µl (10X), DNTP's 2.5 µl (2mM), Iniciador 2 µl (10 µM), MgCl 2.5 µl (30 Mm),

Taq (Amplicasa 500U, Biotecmol) 2.5 U (5U/ μ l), DNA 5 μ l y agua destilada hasta completar el volumen final de la mezcla.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (TECHNE TC-412, Acceso Lab), compuesto con un programa compuesto por desnaturalización inicial (94°C durante 4 min), desnaturalización (94°C durante 40 seg.) alineamiento (58°C durante 40 seg.) extensión (72°C durante 40 seg) 40 ciclos y extensión final 72 °C durante 5 minutos.

Finalmente, los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis a 100 volts en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio y visualizados mediante luz ultravioleta en un transiluminador.

Como control positivo se empleó la vacuna de *Brucella abortus* dosis reducida CEPA-19 (Bruce R-19, Reg,SAGARPA B-0653-043), el liofilizado fue resuspendido en 5 mL de agua inyectable estéril.

7.4.6 Desarrollo de PCR para *Neospora caninum*

Con base en el espaciador interno transcrito 1 (ITS1) del DNA ribosomal de *Neospora caninum*, se utilizaron los iniciadores pN1 (5'- CTCCTTCGGAGAGGGGTA-3') y pN2 (5'- TCTTCCCTCAAA CGCTAT C -3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, Estados Unidos) que amplifican un fragmento de 279 pares de bases. Para el desarrollo de PCR, se utilizó una mezcla de 25 μ l compuesto por: Buffer 2.5 μ l (10X), DNTP's 2.5 μ l (2mM), Iniciador 1.25 μ l (10 μ M), MgCl 2.08 μ l (30 Mm), Taq (Amplicasa 500U, Biotecmol) 2.5 U (5U/ μ l), DNA 5 μ l y agua destilada hasta completar el volumen final de la mezcla.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (TECHNE TC-412, Acceso Lab), compuesto con un programa compuesto por desnaturalización inicial (94°C

durante 5 min), desnaturalización (95°C durante 30 seg.) alineamiento (54°C durante 1) extensión (72°C durante 1 min) 35 ciclos y extensión final 72°C durante 10 minutos.

Finalmente los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis a 100 volts en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio y visualizados mediante luz ultravioleta en un transiluminador.

(Sánchez y col., 2009).

7.5 Estudio serológico

A las vacas que abortaron estos fetos, se les tomo 10 mL de sangre sin anticoagulante alrededor del tiempo de aborto (1-15 días) a través de la vena coccígea, la cual fue centrifugada a 3500 rpm durante 10 min para separar el suero, y se colocó en tubos Eppendorf rotulados y congelaron a -20°C hasta su procesamiento. Las muestras de suero de cada vaca se sometieron a la detección de anticuerpos a través de diversas técnicas según corresponda a cada enfermedad.

En el caso de la detección de anticuerpos anti-BVDV, anti-BHV-1 se procesaron por medio de la técnica de ELISA competitiva empleada en el laboratorio del Departamento de Genética y Estadística, de la FMVZ, UNAM CDMX, MÉXICO. Para *Neospora caninum*, se empleó el juego de reactivos comerciales (*Neospora caninum* antibody test kit, Celisa, Laboratorios VMRD, Maine, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de anticuerpos contra *Leptospira*, se realizó la técnica de aglutinación microscópica (MAT) contra un panel de diferentes serovariedades de Leptospiras: *L. Autummalis*, *Akiyami A*, *Bataviae*, *Van Tienen*, *Bratislava*, *Jez Bratislava*, *Canicola*, *Hond Utrecht IV*,

Celledoni, Cellodoni, Grippotyphosa, Hardjo, Hardjoprajitno, Ictehohaemorrhagiae RGA, Pomona, Pomona, Pyrogenes, Salinem Tarassovi, Perepelicin, Wolffi, 3705 con los reactivos y el método utilizado por el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (Mayers, 1989). En el caso de la detección de anticuerpos contra *Brucella*, se utilizó la prueba de aglutinación en tarjeta y las muestras positivas fueron confirmadas por la prueba de Rivanol con el uso de reactivos y el método utilizado por el Laboratorio de Pruebas y Diagnóstico en Salud Animal Tizayuca, Asociación Ganadera Local de Productores de Leche, Tizayuca, Hidalgo. (Leal y Martínez, 2001).

7.6 Encuesta

Se realizó una encuesta del historial reproductivo de las 20 vacas que abortaron, tomando en cuenta fecha de aborto, último servicio, tiempo de gestación, además, se obtuvo información del historial de vacunación.

El tiempo de gestación se obtuvo por diferencia de fechas del último servicio a la fecha de presentación del aborto. Para ubicar en una categoría el tercio de gestación se tomó en cuenta que la gestación del bovino es de 280 días y cada tercio se dividió en 93 días, es decir para el primer tercio 1-93 días, segundo tercio 94-187 días y último tercio de 188-280 días.

7.7 Análisis de los datos

Los datos se analizaron por estadística no paramétrica con distribución de Ji^2 , Pruebas de independencia, Kappa de Cohen y Spearman's utilizando el programa SPSS.

8. RESULTADOS

8.1 Histopatología

Se realizó la revisión de corazón, pulmón, riñón, hígado y cerebro de cada feto abortado en busca de lesiones sugerentes de un proceso infeccioso. Las principales lesiones observadas en los 20 fetos se resumen en el Cuadro 1. Las lesiones observadas con mayor frecuencia fueron hepatitis y neumonías. El feto 3 presentó quistes parasitarios compatibles con *Neospora caninum*. Las lesiones clasificadas de acuerdo al grado de lesión se resumen en el Cuadro 2, donde 0= sin lesión, 1= leve, 2= moderada, 3= severa.

Cuadro 1. Lesiones histológicas observadas en los órganos de 20 fetos

Número de feto	Corazón	Pulmón	Hígado	Riñón	Cerebro	Diagnóstico presuntivo
1			Degeneración vacuolar moderada, difusa, con hepatitis periportal, linfoplasmocítica, leve	Nefritis intersticial, linfoplasmocítica, multifocal, leve	Encefalitis linfoplasmocítica, perivascular, leve.	Neosporosis, Diarrea Viral Bovina, IBR y Leptospirosis
2	Epicarditis y miocarditis linfoplasmocítica, multifocal, moderada	Broncoaspiración por meconio y líquido amniótico	Hepatitis linfoplasmocítica, periportal, leve		Encefalitis linfoplasmocítica, perivascular, leve	Neosporosis. Diarrea Viral Bovina e IBR
3		Broncoaspiración por líquido amniótico y meconio.			Necrosis y gliosis, multifocal moderada con estructura parasitaria intraneuronal.	Neosporosis
4		Bronconeumonía supurativa, difusa, moderada	Hepatitis linfoplasmocítica, periportal, moderada		Meningitis linfoplasmocítica, difusa, moderada. Hemorragia focal, leve.	Leptospirosis, Brucelosis, Diarrea Viral Bovina e IBR
5	Pericarditis linfocítica, multifocal, leve		Hepatitis linfoplasmocítica periportal, moderada	Nefritis intersticial y periglomerular linfoplasmocítica, multifocal, grave	Necrosis y microgliosis, focal, moderada	Neosporosis y Leptospirosis
6				Hemorragias multifocales	Congestión	Inespecíficas
7		Bronconeumonía linfocítica y fibrinosa, difusa, grave				Brucelosis, Leptospirosis y otros agentes bacterianos

Continuación Lesiones histológicas observadas en los órganos de 20 fetos

Número de feto	Corazón	Pulmón	Hígado	Riñón	Cerebro	Diagnóstico presuntivo
8	Epicarditis linfoplasmocítica moderada.		Hepatitis linfoplasmocítica periportal moderada.		Gliosis y necrosis multifocal, leve	Neosporosis
9		Bronquitis necro-suprativa multifocal severa y arteritis linfoplasmocítica leve	Hepatitis linfoplasmocítica periportal , leve	Nefritis intersticial, linfoplasmocítica, multifocal, leve		Neosporosis, Brucelosis, Leptospirosis, IBR
10	Pericarditis linfoplasmocítica focal moderada	Bronconeumonía supurativa multifocal con arteritis leve neutrofilica. Broncoaspiración de líquido amniótico.	Hepatitis linfoplasmocítica periportal , leve		Meningitis linfoplasmocítica multifocal leve Encefalitis linfoplasmocítica perivascular leve	Neosporosis, Brucelosis, Leptospirosis. Diarrea Viral Bovina e IBR
11	Pericarditis linfoplasmocítica, multifocal, leve		Hepatitis linfoplasmocítica periportal moderada	Nefritis intersticial linfoplasmocítica moderada focal.		Leptospirosis, Neosporosis
12	Perivasculitis multifocal leve en pericardio	Bronquitis y bronquiolitis necrótica severa.	Hepatitis necrótica y linfoplasmocítica multifocal leve			Neosporosis, IBR
13	Miocarditis linfoplasmocítica multifocal leve con focos de mineralización.		Hepatitis necrótica multifocal moderada con infiltrado periportal moderado			Neosporosis IBR
14	Pericarditis linfoplasmocítica moderada		Hepatitis linfocítica y supurativa periportal moderada	Nefritis intersticial, linfoplasmocítica, multifocal, leve	Meningitis linfoplasmocítica moderada con necrosis perivascular.	Neospora, Leptospirosis, Diarrea Viral Bovina e IBR
15	Pericarditis y miocarditis linfoplasmocítica multifocal leve	Neumonía linfoplasmocítica multifocal moderada	Hepatitis linfoplasmocítica periportal moderada	Nefritis intersticial, linfoplasmocítica, multifocal, leve	Necrosis y gliosis, multifocal moderada con meningitis linfoplasmocítica moderada.	Neosporosis, Leptospirosis, Diarrea Viral Bovina e IBR

Continuación Lesiones histológicas observadas en los órganos de 20 fetos

Número de feto	Corazón	Pulmón	Hígado	Riñón	Cerebro	Diagnóstico presuntivo
16	Degeneración de cardiomiocitos multifocal moderada Pericarditis linfoplasmocítica leve	Neumonía linfoplasmocítica intersticial leve	Hepatitis linfoplasmocítica perivascular y periportal leve			Brucelosis e IBR
17		Bronconeumonía linfoplasmocítica moderada Bronquiolitis necrótica y supurativa multifocal severa Vasculitis linfoplasmocítica	Hepatitis linfoplasmocítica periportal leve		Meningitis multifocal moderada	Brucelosis, Diarrea Viral Bovina e IBR
18	Degeneración de cardiomiocitos multifocal leve	Neumonía intersticial infoplasmocítica moderada con hemorragias multifocales	Hepatitis necrótica multifocal leve		Leucomalacia perivascular multifocal leve con hemorragias y meningitis hemorrágica	Diarrea Viral Bovina e IBR
19		Neumonía intersticial infoplasmocítica mederada con hemorragias multifocales	Hepatitis necrótica y supurativa multifocal leve con degeneración vacuolar leve		Encefalitis linfoplasmocítica multifocal leve	Diarrea Viral Bovina e IBR
20	Pericarditis y miocarditis linfoplasmocítica multifocal leve	Bronconeumonía supurativa y necrótica difusa grave Vasculitis linfoplasmocítica y necrosis fibrinoide multifocal grave	Hepatitis supurativa multifocal leve Hepatitis linfoplasmocítica perivascular moderada			Brucelosis, Leptospirosis, Diarrea Viral Bovina e IBR

Cuadro 2. Lesiones histológicas encontradas en 20 fetos abortados de acuerdo al grado de lesión. 0= sin lesión, 1= leve, 2= moderada, 3= severa

Número de feto	Corazón Miocarditis/ pericarditis	Pulmón Neumonía	Hígado Hepatitis/Necrosis	Riñón Nefritis, hemorragia	Cerebro Encefalitis/ Microgliosis	Diagnóstico presuntivo
1	0	0	1	1	1	Neosporosis, Diarrea Viral Bovina, IBR y Leptospirosis
2	2	0	1	0	1	Neosporosis, Diarrea Viral Bovina e IBR
3	0	0	0	0	2	Neosporosis
4	0	2	2	0	2	Leptospirosis, Brucelosis, Diarrea Viral Bovina e IBR
5	1	0	2	3	2	Neosporosis y Leptospirosis
6	0	0	0	1	0	Inespecífico
7	0	3	0	0	0	Brucelosis, Leptospirosis y otros agentes bacterianos
8	2	0	2	0	1	Neosporosis
9	0	3	1	1	0	Neosporosis, Brucelosis, Leptospirosis, IBR
10	2	1	1	0	1	Neosporosis, Brucelosis, Leptospirosis. Diarrea Viral Bovina e IBR
11	1	0	2	2	0	Leptospirosis, Neosporosis
12	1	3	1	0	0	Neosporosis, IBR
13	1	0	2	0	0	Neosporosis IBR
14	2	0	2	1	1	Neosporosis, Leptospirosis, Diarrea Viral Bovina e IBR

Continuación Lesiones histológicas encontradas en 20 fetos abortados de acuerdo al grado de lesión. 0= sin lesión, 1= leve, 2= moderada, 3= severa

Número de feto	Corazón Miocarditis/ pericarditis	Pulmón Neumonía	Hígado Hepatitis/Necrosis	Riñón Nefritis, hemorragia	Cerebro Encefalitis/ Microgliosis	Diagnóstico presuntivo
15	1	2	2	1	2	Neosporosis, Leptospirosis, Diarrea Viral Bovina e IBR
16	2	1	1	0	0	Brucelosis e IBR
17	0	2	1	0	2	Brucelosis, Diarrea Viral Bovina e IBR
18	1	2	1	0	1	Diarrea Viral Bovina e IBR
19	0	2	1	0	1	Diarrea Viral Bovina e IBR
20	1	3	1	0	0	Brucelosis, Leptospirosis, Diarrea Viral Bovina e IBR

8.2 PCR y PCR-RT

Se encontraron resultados positivos para más de un agente infeccioso por órgano de cada feto (Cuadro 3). Las co-infecciones más comunes fueron IBR con DBV en 5 fetos e IBR con Leptospirosis en 3 fetos. En el Cuadro 4, se resume la positividad por agente infeccioso por cada feto.

Cuadro 3. Resultados de PCR y PCR-RT por cada órgano de cada feto. N=negativo, P=positivo

Número de feto	Agente infeccioso	Órgano				
		Corazón	Pulmón	Hígado	Riñón	Cerebro
1	IBR	P	P	P	N	P
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	N	N	N	N
	Leptospirosis	N	P	P	P	N
	DBV	N	N	N	N	N
2	IBR	P	P	P	N	P
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	N	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	N	P	N
	DBV	N	N	N	N	N
3	IBR	N	N	N	N	N
	Neosporosis	N	N	N	N	P
	Brucelosis	N	N	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	N	P	P
	DBV	P	N	N	N	N
4	IBR	N	N	N	N	N
	Neosporosis	N	P	N	N	N
	Brucelosis	P	P	N	P	P
	Leptospirosis	N	P	N	N	N
	DBV	N	N	N	N	N
5	IBR	P	P	N	N	N
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	N	P	N	N
	Leptospirosis	P	N	P	N	N
	DBV	N	N	N	N	N

Continuación, resultados de PCR y PCR-RT por cada órgano de cada feto.
 N=negativo, P=positivo

Número de feto	Agente infeccioso	Órgano				
		Corazón	Pulmón	Hígado	Rinón	Cerebro
6	IBR	P	N	N	N	P
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	N	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	N	N	N
	DBV	N	N	P	N	N
7	IBR	P	N	N	N	N
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	P	N	N	N
	Leptospirosis	N	P	P	P	N
	DBV	N	N	N	N	N
8	IBR	N	N	N	P	N
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	P	P	P	N
	Leptospirosis	N	N	N	N	N
	DBV	N	N	N	N	N
9	IBR	N	N	N	P	P
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	P	N	N	N
	Leptospirosis	N	P	P	P	N
	DBV	N	P	N	N	N
10	IBR	N	P	P	P	P
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	N	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	N	N	N
	DBV	N	N	N	N	N
11	IBR	N	N	N	N	N
	Neosporosis	P	P	N	P	N
	Brucelosis	N	N	N	P	P
	Leptospirosis	P	P	N	P	N
	DBV	N	N	N	N	N
12	IBR	N	P	N	N	P
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	N	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	N	N	N
	DBV	P	N	P	N	P
13	IBR	N	P	N	N	P
	Neosporosis	N	N	P	P	N
	Brucelosis	P	P	P	P	P
	Leptospirosis	N	N	N	P	N
	DBV	N	N	N	N	N

Continuación, resultados de PCR y PCR-RT por cada órgano de cada feto.
 N=negativo, P=positivo

Número de feto	Agente infeccioso	Órgano				
		Corazón	Pulmón	Hígado	Rinón	Cerebro
14	IBR	P	P	P	N	N
	Neosporosis	N	N	N	N	P
	Brucelosis	N	N	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	P	N	N
	DBV	N	N	N	N	N
15	IBR	N	N	P	N	N
	Neosporosis	N	N	N	P	P
	Brucelosis	N	P	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	N	N	N
	DBV	N	N	N	N	N
16	IBR	P	P	N	N	N
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	P	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	N	N	N
	DBV	N	N	N	N	N
17	IBR	P	N	N	N	N
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	N	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	N	P	P
	DBV	N	N	N	N	N
18	IBR	N	P	P	N	P
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	N	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	N	N	N
	DBV	N	P	N	P	P
19	IBR	P	P	P	P	P
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	N	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	N	N	N
	DBV	P	P	N	N	P
20	IBR	N	N	P	P	N
	Neosporosis	N	N	N	N	N
	Brucelosis	N	N	N	N	N
	Leptospirosis	N	N	N	N	N
	DBV	N	N	N	P	N

Cuadro 4. Resultados de PCR y PCR-RT por feto de acuerdo a cada enfermedad. N=negativo, P=positivo. PCR=Reacción en cadena de la polimerasa. RT=Retrotranscriptasa variedad de PCR. IBR=Rinotraqueitis infecciosa bovina, Neo=Neosporosis, BRU=Brucelosis, LEP=Leptospirosis y DVB=Diarrea Viral Bovina.

Número de feto	PCRIBR	PCRNEO	PCRBRU	PCRLEP	RTDVB
1	P	N	N	P	N
2	N	N	N	P	N
3	N	P	N	P	P
4	N	P	P	P	N
5	N	N	P	P	N
6	P	N	N	N	P
7	P	N	P	P	N
8	P	N	P	N	N
9	P	N	P	P	P
10	P	N	N	N	N
11	N	P	P	P	N
12	P	N	N	N	P
13	P	P	P	P	N
14	P	P	N	P	N
15	P	P	P	N	N
16	P	N	P	N	N
17	P	N	N	P	N
18	P	N	N	N	P
19	P	N	N	N	P
20	P	N	N	N	P

8.3 Serología

8.3.1 Leptospirosis

En las vacas que presentaron el aborto, se detectaron altos títulos para algunas de las 12 serovariedades de *Leptospira* por la Prueba de Micro Aglutinación en Placa (MAT). Los resultados se resumen en el Cuadro 5. Como punto de corte se dieron como positivos títulos iguales o superiores 1/100 (OIE, 1992). En el Cuadro 6, se muestra en forma resumida los resultados para esta prueba.

Cuadro 5. Titulación de sueros de madres que presentaron el aborto con panel de 12 serovariedades de *Leptospira*.

Identificación	L. Autummalis, Akiyami A	Bataviae, Van Tienen	Bratislava, Jez Bratislava	Canicola, Hond Utrech IV	Celledoni, Cellodoni	Grippotyphosa	Hardjo, Hardjoprajitno	Ictehohaemorrhagiae RGA	Pomona, Pomona	Pyrogenes, Salinem	Tarassovi, Perepelicin	Wolffi, 3705
1	0	0	400	800	0	800	200	100	100	100	100	100
2	200	50	800	3200	0	6400	1600	200	200	1600	0	400
3	0	400	1600	3200	200	1600	1600	800	400	1600	0	800
4	0	200	800	800	0	1600	3200	200	800	1600	0	800
5	0	200	400	1600	400	400	400	100	200	0	0	100
6	0	0	400	800	0	100	200	50	200	400	0	200
7	50	100	800	1600	50	100	100	0	200	100	0	200
8	0	200	200	800	0	800	400	0	200	100	0	400
9	0	400	400	400	200	400	1600	100	200	200	0	100
10	0	200	400	1600	100	200	0	200	100	100	0	50
11	0	100	800	800	100	200	800	100	200	800	0	200
12	100	0	800	800	0	800	800	100	200	400	0	200
13	0	0	1600	800	200	400	200	100	100	400	0	100
14	0	200	1600	3200	200	400	3200	100	400	400	100	400
15	0	0	200	400	0	0	0	0	50	0	100	0
16	0	0	800	800	0	400	800	100	400	0	0	400
17	0	0	400	400	0	200	800	50	200	0	50	400
18	0	0	400	400	0	400	200	0	200	0	0	100
19	0	0	200	400	0	100	50	0	0	0	0	0
20	100	0	400	400	0	400	1600	0	1600	0	0	1600

**Cuadro 6. Sueros positivos y negativos de madres que presentaron el aborto con panel de 12 serovariedades para *Leptospira*.
1=positivo, 0=negativo.**

Identificación	L. Autummalis, Akiyami A	Bataviae, Van Tienen	Bratislava, Jez Bratislava	Canicola, Hond Utrech IV	Celledoni, Cellodoni	Grippotyphosa	Hardjo, Hardjoprajitno	Ictehohaemorrhagiae RGA	Pomona, Pomona	Pyrogenes, Salinem	Tarassovi, Perepelicin	Wolffi, 3705
1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
2	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
4	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
5	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
6	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
7	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
8	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
10	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
11	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
12	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
13	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
14	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
16	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
17	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1
18	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1
19	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
20	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1

8.3.2 Neosporosis, Diarrea Viral Bovina e IBR.

Se corrieron 20 sueros con la técnica de ELISA para *Herpesvirus* (IBR), Diarrea Viral Bovina (DVB) y Neosporosis, los resultados se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Detección de anticuerpos por ELISA contra IBR, DVB y Neosporosis en las 20 vacas que abortaron. 1= positivo, 0= negativo

Identificación suero de la madre	IBR	DVB	NEO
1	1	0	1
2	1	0	0
3	1	0	1
4	1	0	1
5	0	0	1
6	1	0	0
7	0	0	0
8	0	0	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	1
12	0	1	1
13	0	1	0
14	1	0	1
15	1	1	1
16	1	1	1
17	0	0	1
18	1	1	0
19	0	0	0
20	0	1	1

8.3.3 Brucelosis.

Se corrieron 20 sueros con la prueba de tarjeta y Rivanol para *Brucella abortus*.

En el caso particular de la prueba de Rivanol, títulos iguales o mayores a 1/50

se interpretaron como positivos (Servicio Nacional de Sanidad, 2016) Cuadro 8.

Cuadro 8. Sueros positivos y negativos de las madres, en la prueba de Tarjeta y de Rivanol contra *Brucella abortus*, 1= positivo, 0= negativo

Identificación suero de la madre	Brucella tarjeta	Brucella Rivanol
1	1	400
2	0	0
3	0	0
4	1	25
5	0	0
6	1	25
7	1	50
8	1	0
9	1	400
10	1	400
11	1	100
12	1	400
13	1	400
14	1	50
15	1	400
16	1	400
17	1	400
18	1	200
19	1	400
20	1	400

8.4 Encuesta

Para obtener el tiempo de gestación se realizó la diferencia entre fecha del último servicio y día en que se presentó el aborto, así mismo se categorizo en tercios, la mayoría de los abortos se presentaron en el último tercio de gestación con un total de 13. También se obtuvieron los datos de identificación de la madre, número de establo y de vacunación, como se muestra en el Cuadro 9. Las vacas fueron inmunizadas con virus vivo atenuado en el caso de DVB e IBR. En el Cuadro 10 se muestran los resultados integrales en los tejidos de los fetos, así como el resultado serológico de las madres.

Cuadro 9. Resultados de la Encuesta, SD= Sin datos, S=si, N=no

Identificación de feto	Fecha de Aborto	Último Servicio	Gestación	Tercio de gestación	Establo	Identificación madre	Abortos actuales	Vacunación DVB e IBR	Vacunación Leptospira	Vacunación Brucelosis
1	23/01/2016	07/08/2015	169	2	172	4482	1	SD	SD	SD
2	27/01/2016	23/07/2015	188	3	128	936	1	S	S	S
3	15/02/2016	13/06/2015	247	3	176	625	1	S	S	N
4	18/02/2016	20/08/2015	182	2	176	609	1	S	S	N
5	03/03/2016	03/09/2015	182	2	117	58	1	S	S	N
6	04/03/2016	26/07/2015	222	3	219	953	1	S	S	N
7	03/03/2016	23/07/2015	224	3	150	2558	1	S	S	N
8	15/03/2016	05/10/2015	162	2	151	473	1	S	S	S
9	18/03/2016	03/08/2015	228	3	219	1479	1	S	S	N
10	18/03/2016	19/08/2015	212	3	128	932	1	S	S	N
11	12/05/2016	17/10/2015	208	3	128	1081	1	S	S	N
12	27/07/2016	20/01/2016	189	3	122	1597	1	S	S	N
13	21/07/2016	22/12/2015	212	3	125	1784	1	SD	SD	SD
14	18/10/2016	20/04/2016	181	2	160	333	1	N	S	S
15	01/12/2016	04/06/2016	180	2	133	1136	1	SD	SD	SD
16	10/12/2016	05/06/2016	188	2	128	890	1	S	S	N
17	02/12/2016	20/04/2016	226	3	189	1575	1	S	S	N
18	15/06/2017	07/11/2016	220	3	125	1052	1	S	S	S
19	08/08/2017	17/12/2016	234	3	189	1712	1	S	S	S
20	21/08/2017	13/01/2017	220	3	189	1612	1	S	S	N

8.5 Comparación de resultados

Se muestran los resultados de histopatología, PCR y PCR-RT, y de serología. 1=positivo, 0=negativo. En el caso de serología para Lepstospirosis, solo se considera positivo, si fue positivo a una de las tres serovariedades que comúnmente afectan a los bovinos. Cuadro 10.

Cuadro 10. Comparación de histopatología, PCR, PCR-RT y Serología

Identificación del feto	Serología de las Madres					Histopatología					PCR y PCR-RT					Diagnóstico integral					Número de agentes por feto
	IBR	DVB	NEO	BRU	LEP	IBR	DVB	NEO	BRU	LEP	IBR	DVB	NEO	BRU	LEP	IBR	DVB	BRU	LEP	NEO	
1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	3
2	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
3	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	2
4	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	4
5	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	3
6	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	2
7	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	2
8	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	3
9	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	3
10	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2
11	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	3
12	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	5

CUADRO 10. Continuación Comparación de histopatología, PCR, PCR-RT y Serología

Identificación del feto	Serología de las Madres					Histopatología					PCR Y PCR-RT					Diagnóstico integral					Número de agentes por feto
	IBR	DVB	NEO	BRU	LEP	IBR	DVB	NEO	BRU	LEP	IBR	DVB	NEO	BRU	LEP	IBR	DVB	BRU	LEP	NEO	
13	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	4
14	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	4
15	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	3
16	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	4
17	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	4
18	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	4
19	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	3
20	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	5

8.6 Resultados del análisis estadístico

8.6.1 Análisis por órgano y agente infeccioso con la técnica de PCR y PCR-RT

No hubo diferencia estadística significativa para la detección de agentes por órgano ($P > 0.05$) (corazón, pulmón, hígado, riñón y cerebro), es decir la toma de cualquiera de estos órganos es igualmente útil para el diagnóstico de IBR, Leptospirosis, Brucelosis, Neosporosis o DVB por PCR y PCR-RT.

Para el caso de IBR, el pulmón y cerebro tuvieron una frecuencia de 24% para identificar *Herpesvirus tipo I* con respecto a los demás órganos.

Para DVB, el cerebro, pulmón y corazón obtuvieron la mayor frecuencia con 23% cada uno para identificar Flavivirus con respecto a los demás órganos.

Para Neosporosis, el cerebro y riñón tuvieron la mayor frecuencia de 36% y 27% respectivamente para identificar *Neospora caninum* con respecto a los demás órganos.

En el caso de Brucelosis, el pulmón y riñón tuvieron la mayor frecuencia de 37% y 21% respectivamente para identificar *Brucella abortus* con respecto a los demás órganos.

Para el caso de Leptospirosis, el riñón tuvo la mayor frecuencia para identificar *Leptospira borgpetersenii* serovar *Hardjo*, *L. interrogans* serovar *Pomona*, *Leptospira kirschneri* serovar *Grippotyphosa* con respecto a los demás órganos.

8.6.2 Concordancia por órgano entre estudio histopatológico, PCR y PCR-RT

No hubo concordancia para IBR, DVB, Brucelosis y Leptospirosis con las lesiones encontradas por histología de corazón, pulmón, hígado, riñón y cerebro y pruebas moleculares para estos mismos órganos ($P > 0.05$).

No hubo concordancia para Neosporosis entre las lesiones encontradas por histología de corazón, pulmón e hígado, y PCR para estos mismos órganos ($P > 0.05$), sin embargo, si hubo concordancia para Neosporosis entre las lesiones encontradas por histología en cerebro con los resultados de PCR para este mismo órgano ($P = 0.068$), Cuadro 11.

Cuadro 11. Kappa Cohen. Concordancia de lesiones en cerebro, estudio Histopatológico y PCR para Neosporosis.

Tabulación cruzada

Cerebro	PCR Cerebro NEO		Total
	Negativo	Positivo	
Sin lesión	8	0	8
Con lesión	8	4	12
Total	16	4	20

Medidas simétricas

		Valor	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,286	,137	1,826	,068
N of Valid Cases		20			

a. No asumiendo la hipótesis nula

b. Usando el error estándar asintótico asumiendo la hipótesis nula

8.6.3 Asociación entre el grado de lesión por órgano en estudio

histopatológico y PCR

Para IBR no existió asociación entre el grado de lesión encontrada por histopatología en corazón, pulmón, hígado y riñón, y PCR para este mismo órgano ($P > 0.05$), sin embargo, si existió asociación entre el grado de lesión en cerebro y el resultado de PCR para este mismo órgano ($P = 0.014$) Cuadro 12.

Cuadro 12. Asociación entre el grado de lesión y el resultado por PCR en cerebro para IBR

Tabulación cruzada

Grado de lesión en cerebro		PCR Cerebro IBR		Total
		Negativo	Positivo	
Sin lesión	Recuento	4	4	8
	% dentro grado de lesión	50,0%	50,0%	100,0%
	% dentro PCR	40,0%	40,0%	40,0%
Leve	Recuento	1	6	7
	% dentro grado de lesión	14,3%	85,7%	100,0%
	% dentro PCR	10,0%	60,0%	35,0%
Moderado	Recuento	5	0	5
	% dentro grado de lesión	100,0%	,0%	100,0%
	% dentro PCR	50,0%	,0%	25,0%
Total	Recuento	10	10	20
	% dentro grado de lesión	50,0%	50,0%	100,0%
	% dentro PCR	100,0%	100,0%	100,0%

Prueba Chi-cuadrada

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	8,571 ^a	2	,014
Likelihood Ratio	10,894	2	,004
Linear-by-Linear Association	1,892	1	,169
N of Valid Cases	20		

a. Se espera que 6 células (100,0%) cuenten menos de 5. El conteo mínimo esperado es 2,50.

Para Brucelosis no hubo asociación entre el grado de lesión encontrada por histología en corazón, pulmón, riñón y cerebro con los resultados por PCR para estos mismos órganos ($P>0.05$), sin embargo, si hubo asociación entre el grado de lesión encontrada por histología en hígado con los resultados por PCR para este mismo órgano ($P=0.038$) Cuadro 13.

Cuadro 13. Asociación entre el grado de lesión y el resultado por PCR en Hígado para Brucelosis

Tabulación cruzada

Grado de lesión en hígado		PCR hígado BRU		Total
		Negativo	Positivo	
Sin lesión	Recuento	3	0	3
	% dentro grado de lesión	100,0%	,0%	100,0%
	% dentro PCR	17,6%	,0%	15,0%
Leve	Recuento	10	0	10
	% dentro grado de lesión	100,0%	,0%	100,0%
	% dentro PCR	58,8%	,0%	50,0%
Moderado	Recuento	4	3	7
	% dentro grado de lesión	57,1%	42,9%	100,0%
	% dentro PCR	23,5%	100,0%	35,0%
Total	Recuento	17	3	20
	% dentro grado de lesión	85,0%	15,0%	100,0%
	% dentro PCR	100,0%	100,0%	100,0%

Prueba Chi-cuadrada

	Valor	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6,555 ^a	2	,038
Likelihood Ratio	7,348	2	,025
Linear-by-Linear Association	4,665	1	,031
N of Valid Cases	20		

a. 4 células (66,7%) tienen un conteo esperado menor a 5. El recuento mínimo esperado es 45.

Para Leptospirosis, Neosporosis y DVB no existió asociación entre el grado de lesión encontrada por histología en corazón, pulmón, hígado, riñón y cerebro con los resultados en PCR para estos mismos órganos ($P>0.05$).

8.6.4 Asociación de diagnóstico presuntivo en estudio histopatológico con pruebas moleculares y serología

No hubo diferencia estadística significativa ($P>0.05$) entre el diagnóstico presuntivo por histopatología para IBR, DVB, Leptospirosis, Neosporosis y Brucelosis y los resultados serológicos para estas mismas enfermedades, por lo tanto, no están asociados.

No se observó diferencia estadística significativa ($P> 0.05$) entre el diagnóstico presuntivo por histopatología y los resultados de las pruebas moleculares para DVB, Leptospirosis, Neosporosis y Brucelosis, por lo tanto, no están asociados. Sin embargo, el resultado estadístico si fue significativo ($P=0.061$) entre los resultados histopatológicos y el PCR para IBR, por lo tanto, si están asociadas Cuadro 14.

**Cuadro 14. Asociación entre el diagnóstico presuntivo y el resultado por PCR
para IBR**

Tabulación cruzada

			PCR IBR		Total
			Negativo	Positivo	
Histopatología IBR	Negativo	Recuento	3	4	7
		% dentro de Histopatología IBR	42.9%	57.1%	100.0%
		% dentro de PCR IBR	75.0%	25.0%	35.0%
	Positivo	Recuento	1	12	13
		% dentro de Histopatología IBR	7.7%	92.3%	100.0%
		% dentro de PCR IBR	25.0%	75.0%	65.0%
Total	Recuento	4	16	20	
	% dentro de Histopatología IBR	20.0%	80.0%	100.0%	
	% dentro de PCR IBR	100.0%	100.0%	100.0%	

Pruebas de Chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3.516 ^a	1	.061		
Corrección de continuidad ^b	1.662	1	.197		
Razón de verosimilitud	3.404	1	.065		
Prueba exacta de Fisher				.101	.101
Asociación lineal por lineal	3.341	1	.068		
N de casos válidos	20				

a. 2 casillas (50.0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1.40.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

8.6.5 Asociación de Serología de las madres y las Pruebas moleculares

No se encontró asociación estadística ($P > 0.05$) entre las vacas seropositivas para IBR, DVB, Neosporosis, Brucelosis y Leptospirosis y los resultados de las pruebas moleculares en órganos de los fetos.

8.6.6 Concordancia entre el Diagnóstico integral y Pruebas específicas (Estudio histopatológico, Pruebas moleculares y Serología)

Para IBR el estudio histopatológico y PCR tuvieron concordancia con el diagnóstico integral ($P < 0.05$) Cuadro 15 y 16, sin embargo la Serología no tuvo concordancia con el diagnóstico integral ($P > 0.05$).

Cuadro 15. Asociación entre el Diagnóstico Integral e Histopatología para IBR

Tabula cruzada

			Diagnóstico Integral IBR		Total
			Negativo	Positivo	
Histopatología IBR	Negativo	Recuento	6	1	7
		% dentro de Histopatología IBR	85.7%	14.3%	100.0%
		% dentro de Diagnóstico Integral IBR	100.0%	7.1%	35.0%
	Positivo	Recuento	0	13	13
		% dentro de Histopatología IBR	0.0%	100.0%	100.0%
		% dentro de Diagnóstico Integral IBR	0.0%	92.9%	65.0%
Total	Recuento	6	14	20	
	% dentro de Histopatología IBR	30.0%	70.0%	100.0%	
	% dentro de Diagnóstico Integral IBR	100.0%	100.0%	100.0%	

Medidas simétricas

		Valor	Error estandarizado asintótico ^a	T aproximada ^b	Significación aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.886	.110	3.990	0.000066
N de casos válidos		20			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

Cuadro 16. Asociación entre el Diagnóstico Integral y PCR para IBR

Tabla cruzada

			Diagnóstico Integral IBR		Total
			Negativo	Positivo	
PCR IBR	Negativo	Recuento	3	1	4
		% dentro de PCR IBR	75.0%	25.0%	100.0%
		% dentro de Diagnóstico Integral IBR	50.0%	7.1%	20.0%
	Positivo	Recuento	3	13	16
		% dentro de PCR IBR	18.8%	81.3%	100.0%
		% dentro de Diagnóstico Integral IBR	50.0%	92.9%	80.0%
Total	Recuento	6	14	20	
	% dentro de PCRIBR	30.0%	70.0%	100.0%	
	% dentro de DXI IBR	100.0%	100.0%	100.0%	

Medidas simétricas

		Valor	Error estandarizado asintótico ^a	T aproximada ^b	Significación aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.474	.219	2.196	.028
N de casos válidos		20			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

Para DVB en la prueba de serología y PCR-RT si hubo concordancia con el diagnóstico integral ($P=0.028$) y ($P=0.002$), respectivamente Cuadro 17 y 18, sin embargo, para el estudio Histopatológico para DVB no hubo concordancia con el diagnóstico integral ($P>0.05$).

Cuadro 17. Asociación entre el Diagnóstico Integral y Serología para DVB

Tabla cruzada

Diagnóstico Integral DVB		Serología DVB		Total
		Negativo	Positivo	
Negativo	Recuento	13	3	16
	% dentro de Diagnóstico Integral	81.3%	18.8%	100.0%
	% dentro de Serología DVB	92.9%	50.0%	80.0%
Positivo	Recuento	1	3	4
	% dentro de Diagnóstico Integral	25.0%	75.0%	100.0%
	% dentro de Serología DVB	7.1%	50.0%	20.0%
Total	Recuento	14	6	20
	% dentro de Diagnóstico Integral	70.0%	30.0%	100.0%
	% dentro de Serología DVB	100.0%	100.0%	100.0%

Medidas simétricas

		Valor	Error estandarizado asintótico ^a	T aproximada ^b	Significación aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.474	.219	2.196	.028
N de casos válidos		20			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

Cuadro 18. Asociación entre el Diagnóstico Integral y PCR-RT para DVB

Tabla cruzada

Diagnóstico Integral DVB		PCR-RT DVB		Total
		Negativo	Positivo	
Negativo	Recuento	13	3	16
	% dentro de DXI DVB	81.3%	18.8%	100.0%
	% dentro de RTDVB	100.0%	42.9%	80.0%
Positivo	Recuento	0	4	4
	% dentro de DXI DVB	0.0%	100.0%	100.0%
	% dentro de RTDVB	0.0%	57.1%	20.0%
Total	Recuento	13	7	20
	% dentro de DXI DVB	65.0%	35.0%	100.0%
	% dentro de RTDVB	100.0%	100.0%	100.0%

Medidas simétricas

	Valor	Error estandarizado asintótico ^a	T aproximada ^b	Significación aproximada
Medida de acuerdo Kappa	.634	.181	3.047	.002
N de casos válidos	20			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

Para Neosporosis la prueba de PCR y Serología si tienen concordancia con el diagnóstico integral ($P=0.0001$) Cuadro 19, sin embargo, para el Estudio Histopatológico no tiene concordancia con el diagnóstico integral ($P>0.05$).

Cuadro 19. Asociación entre el Diagnóstico Integral y Serología para Neosporosis

Tabla cruzada

		Diagnóstico Integral		Total
		Negativo	Positivo	
Serología Neosporosis	Negativo	7	1	8
	Positivo	0	12	12
Total		7	13	20

Medidas simétricas

		Valor	Error estandarizado asintótico ^a	T aproximada ^b	Significación aproximada.
Medida de acuerdo	Kappa	,894	,103	4,019	0,0001
N de casos válidos					

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

Para Brucelosis en la prueba de PCR y Serología si hubo concordancia con el diagnóstico integral ($P<0.05$) Cuadro 20 y 21, sin embargo, para el Estudio Histopatológico no hubo concordancia con el diagnóstico integral ($P>0.05$)

Cuadro 20. Asociación entre el Diagnóstico integral y PCR para Brucelosis

Tabla cruzada

		Diagnóstico Integral		Total
		Negativo	Positivo	
PCR Brucelosis	Negativo	4	7	11
	Positivo	0	9	9
Total		4	16	20

Medidas simétricas

		Valor	Error estandarizado asintótico ^a	T ^b Aproximada	Significación aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	,340	,151	2,023	,043
N de casos válidos					

a. No asumiendo la hipótesis nula

b. Usando el error estándar asintótico asumiendo la hipótesis nula.

Cuadro 21. Asociación entre el Diagnóstico integral y Serología para Brucelosis

Tabla cruzada

		Diagnóstico Integral		Total
		Negativo	Positivo	
Serología Brucelosis	Negativo	3	3	6
	Positivo	1	13	14
Total		4	16	20

Medidas simétricas

		Valor	Error estandarizado asintótico ^a	T ^b Aproximado	Significancia Aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	,474	,219	2,196	,028
N de casos válidos					

a. No asumiendo la hipótesis nula

b. Usando el error estándar asintótico asumiendo la hipótesis nula.

Para Leptospirosis en la prueba de Serología si hubo concordancia con el diagnóstico integral (P=0.0003) Cuadro 22, de igual forma hubo concordancia para el PCR (P=0.03) Cuadro 22, sin embargo, para el Estudio Histopatológico no hubo concordancia con el diagnóstico integral (P>0.05).

Cuadro 22. Asociación entre el Diagnóstico integral y Serología para Leptospirosis

Tabla cruzada

			Diagnóstico Integral		Total
			Negativo	Positivo	
Serología Leptospirosis	Negativo	Recuento	2	0	2
		% dentro de Serología	100.0%	0.0%	100.0%
		% dentro de Diagnóstico Integral	66.7%	0.0%	10.0%
	Positivo	Recuento	1	17	18
		% dentro de SLeptospira	5.6%	94.4%	100.0%
		% dentro de DXI LEP	33.3%	100.0%	90.0%
Total	Recuento	3	17	20	
	% dentro de SLeptospira	15.0%	85.0%	100.0%	
	% dentro de DXI LEP	100.0%	100.0%	100.0%	

Medidas simétricas

		Valor	Error estandarizado asintótico ^a	T aproximada ^b	Significación aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.773	.216	3.549	0.000387
N de casos válidos		20			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

Cuadro 23. Asociación entre el Diagnóstico integral y PCR para Leptospirosis

Tabla cruzada

			Diagnóstico Integral		Total
			Negativo	Positivo	
PCR Leptospirosis	Negativo	Recuento	3	6	9
		% dentro de PCR	33.3%	66.7%	100.0%
		% dentro de Diagnóstico Integral	100.0%	35.3%	45.0%
	Positivo	Recuento	0	11	11
		% dentro de PCR	0.0%	100.0%	100.0%
		% dentro de Diagnóstico Integral	0.0%	64.7%	55.0%
Total	Recuento		3	17	20
	% dentro de PCR		15.0%	85.0%	100.0%
	% dentro de Diagnóstico Integral		100.0%	100.0%	100.0%

Medidas simétricas

		Valor	Error estandarizado asintótico ^a	T aproximada ^b	Significación aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.355	.168	2.077	.038
N de casos válidos		20			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

8.6.7 Frecuencia de agentes infecciosos por feto y correlación múltiple en el diagnóstico integral

En 19 fetos (95%), se detectó que había más de un agente infeccioso involucrado en el aborto. Cuadro 24. En la prueba de Rho de Spearman, no existe correlación múltiple entre las enfermedades de IBR, DVB, Neosporosis, Leptospirosis y Brucelosis y el diagnóstico integral ($P > 0.05$) Cuadro 25.

Cuadro 24. Número de agentes infecciosos involucrados en el aborto

Diagnóstico Integral						
Número de feto	IBR	DVB	BRU	LEP	NEO	Número de Agentes Infecciosos por feto abortado
1	1	0	0	1	1	3
2	0	0	0	1	0	1
3	0	0	0	1	1	2
4	1	0	1	1	1	4
5	0	0	1	1	1	3
6	1	0	0	1	0	2
7	0	0	1	1	0	2
8	0	0	1	1	1	3
9	1	0	1	1	0	3
10	1	0	1	0	0	2
11	0	0	1	1	1	3
12	1	1	1	1	1	5
13	1	0	1	1	1	4
14	1	0	1	1	1	4
15	1	0	1	0	1	3
16	1	0	1	1	1	4
17	1	0	1	1	1	4
18	1	1	1	1	0	4
19	1	1	1	0	0	3
20	1	1	1	1	1	5

Cuadro 25. Prueba de Rho de Spearman correlación múltiple entre los agentes infecciosos involucrados en el aborto de 20 fetos de bovino. DXI=Diagnóstico Integral

Correlaciones

Rho de Spearman		DXI IBR	DXI DVB	DXI Brucelosis	DXI Leptospirosis	DXI Neosporosis
DXI IBR	Correlación de Pearson	1	.327	.218	-.275	-.023
	Sig. (bilateral)		.159	.355	.241	.924
	N	20	20	20	20	20
DXI DVB	Correlación de Pearson	.327	1	.250	-.140	-.157
	Sig. (bilateral)	.159		.288	.556	.508
	N	20	20	20	20	20
DXI Brucelosis	Correlación de Pearson	.218	.250	1	-.210	.157
	Sig. (bilateral)	.355	.288		.374	.508
	N	20	20	20	20	20
DXI Leptospirosis	Correlación de Pearson	-.275	-.140	-.210	1	.279
	Sig. (bilateral)	.241	.556	.374		.234
	N	20	20	20	20	20
DXI Neosporosis	Correlación de Pearson	-.023	-.157	.157	.279	1
	Sig. (bilateral)	.924	.508	.508	.234	
	N	20	20	20	20	20

8.7 Resultados de frecuencia de abortos por tercio de gestación

Los tercios de gestación se comparan con los diagnósticos integrales para conocer cuáles fueron los agentes infecciosos involucrados en el aborto Cuadro 26. Para IBR 5 vacas (1,4,14, 15 y 16) presentaron el aborto en el segundo tercio de la gestación, y 9 vacas (6, 9, 10, 12, 13, 17, 18 ,19 y 20) presentaron el aborto en el tercer tercio de gestación. Para DVB 4 vacas (12,18,19 y 20) presentaron el aborto en el tercer tercio de gestación. Para Brucelosis 6 vacas (8, 4, 5,14, 15 y 16) presentaron el aborto en el segundo tercio y 10 vacas (7, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 19 y 20) en el tercer tercio de gestación. Para Leptospirosis 6 vacas (1, 4, 5, 8, 14 y 16) presentaron el aborto en el segundo tercio de gestación y 11 vacas (2, 3, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 17, 18 y 20) en el tercer tercio de gestación. Para Neosporosis 7 vacas (1, 4, 5, 8, 14, 15 y 16) presentaron el aborto en el segundo tercio de gestación y 6 vacas (3, 11, 12,13, 17 y 20) en el tercer tercio de gestación.

Cuadro 26. Frecuencia de abortos por tercio de gestación y Diagnóstico Integral
0= Negativo,1=Positivo. Azul=2/3 Gestación, Anaranjado=3/3 Gestación

Identificación	Días de Gestación	Tercio de la gestación	Meses de gestación	Diagnóstico Integral IBR	Diagnóstico Integral DVB	Diagnóstico Integral Brucelosis	Diagnóstico Integral Leptospirosis	Diagnóstico Integral Neosporosis
1	169	2	5.6	1	0	0	1	1
2	188	3	6.3	0	0	0	1	0
3	247	3	8.2	0	0	0	1	1
4	182	2	6.1	1	0	1	1	1
5	182	2	6.1	0	0	1	1	1
6	222	3	7.4	1	0	0	1	0
7	224	3	7.5	0	0	1	1	0
8	162	2	5.4	0	0	1	1	1
9	228	3	7.6	1	0	1	1	0
10	212	3	7.1	1	0	1	0	0
11	208	3	6.9	0	0	1	1	1
12	189	3	6.3	1	1	1	1	1
13	212	3	7.1	1	0	1	1	1
14	181	2	6.0	1	0	1	1	1
15	180	2	6.0	1	0	1	0	1
16	189	2	6.3	1	0	1	1	1
17	226	3	7.5	1	0	1	1	1
18	220	3	7.3	1	1	1	1	0
19	234	3	7.8	1	1	1	0	0
20	220	3	7.3	1	1	1	1	1

9. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados, aunque no se obtuvo significancia estadística ($P > 0.05$) que apoyara que el envío de un órgano en particular (corazón, pulmón, hígado, riñón o cerebro) es indispensable para el diagnóstico de IBR, DVB, Neosporosis, Leptospirosis y Brucelosis, debe tomarse con reserva debido a que solo se estudiaron 20 fetos cuya distribución de las lesiones pudo ser aleatoria. De forma similar, en un estudio realizado por Tramuta y col. (2011), donde se seleccionaron 50 fetos que no presentaron lesiones pero eran sugestivas de un proceso infeccioso, se estandarizó una PCRm (Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple), para el diagnóstico de 13 agentes entre los que se incluían *Brucella* spp., *Leptospira* spp., *Neospora caninum*, virus de la Diarrea Viral Bovina y *Herpesvirus* bovino 1, tampoco se demostró que el empleo de un órgano en específico es indispensable para el diagnóstico de alguna enfermedad, y solo en un caso se observó la presencia simultánea de DVB y *Neospora caninum*. En el presente estudio, *Herpesvirus* tipo 1, fue detectado con mayor frecuencia (24%) mediante PCR en pulmón y cerebro, y *Pestivirus* (DVB) fue detectado con mayor frecuencia (23%) mediante PCR-RT en cerebro, pulmón y corazón, por lo que se sugiere procesar estos órganos cuando se emplean estas técnicas. De forma similar, en becerros se ha hecho la identificación del antígeno pestivirus por Inmunohistoquímica, PCR-RT y aislamiento en órganos como pulmón y cerebro entre otros (Lieber y col., 1997).

Neospora caninum fue detectado mediante PCR con mayor frecuencia en cerebro (36%) y riñón (27%). Con respecto al riñón, este resultado coincide con lo reportado en la literatura (Locatelli y col., 2018), donde también se demostró

la importancia del empleo de este órgano en el feto de bovino abortado para el aislamiento de taquizoítos de este protozooario.

Brucella abortus fue detectada con mayor frecuencia mediante PCR en pulmón (37%), mientras que *Leptospira borgpetersenii* serovar *Hardjo*, *L. interrogans* serovar *Pomona*, *Leptospira kirschneri* serovar *Grippotyphosa* fueron detectadas con mayor frecuencia en riñón (32%), pulmón e hígado (22%) por lo que también se sugiere procesar estos órganos por PCR cuando se sospecha de aborto por éstos agentes, ya que aumenta la sensibilidad en el diagnóstico.

Aunque no hubo correlación estadística ($P > 0.05$) por órgano entre la ausencia o presencia de lesión por histopatología y los resultados de los estudios moleculares para IBR, DVB, Brucelosis y Leptospirosis, todos los fetos presentaron lesiones al menos en un órgano por lo cual se sospechó que estaba involucrado uno o más agentes infecciosos en los abortos. Es por ello que el estudio histológico debe usarse como prueba inicial para indicar si el aborto es de origen infeccioso. En el presente estudio se observó que en 8 fetos se detectaron 4 agentes, en 7 fetos 3 agentes, en 4 fetos 2 agentes y solo a 1 se les detectó 1 agente en el diagnóstico integral (Cuadro 23), lo cual indica que las lesiones observadas pueden ser producidas por más de un agente infeccioso dificultando el diagnóstico histopatológico presuntivo. Aunado a esto, en el presente estudio sólo se estudiaron 5 agentes infecciosos, sin embargo, pudieron estar involucrados otros agentes infecciosos como *Trueperella pyogenes*, *Campylobacter fetus*, *Coxiella burnetii*, *Ureaplasma diversum*, entre otros reportados en el aborto bovino (Tramuta y col. 2011). En el caso de Neosporosis si hubo concordancia entre las lesiones encontradas en cerebro y los resultados positivos de PCR para este mismo órgano ($P=0.068$), Cuadro 11,

por lo cual se recomienda que cuando se sospeche de aborto por *Neospora caninum*, se remita este órgano. Al respecto en un estudio similar realizado por Diniz y col., (2009), concluyeron que las muestras que mostraron lesiones características de Neosporosis en cerebro por histopatología, fueron frecuentemente positivas en inmunohistoquímica y PCR-anidada para este agente.

Con respecto a los resultados obtenidos entre el grado de lesión y PCR para IBR en el presente estudio, la literatura indica (Cárdenas y col., 2006) que un órgano importante para el diagnóstico de aborto por IBR es el hígado ya sea por histopatología, inmunofluorescencia, aislamiento viral o inmunohistoquímica, al respecto en el presente estudio en el caso de Herpesvirus tipo 1, existió asociación entre el grado de lesión en cerebro y el resultado de PCR para este mismo órgano ($P=0.014$) Cuadro 12, por lo que se considera un órgano importante para el diagnóstico. Cabe mencionar que en ningún órgano de los fetos analizados se encontraron inclusiones virales intranucleares características de infección por Herpesvirus tipo 1, lo cual podría estar asociado con la etapa de replicación del virus, debido a que solo se presenta en los primeros días de la infección (Mahajan y col., 2013). En un estudio realizado por Moeller y col., 2013, se encontró que los cuerpos de inclusión para esta enfermedad eran comunes en glándula adrenal, cabe mencionar que dicho órgano no se incluyó porque el criterio de selección se hizo con base en órganos comúnmente afectados por estas cinco enfermedades.

Para Brucelosis se encontró asociación entre el grado de lesión encontrada por histopatología en hígado con los resultados por PCR para este mismo órgano ($P=0.038$) Cuadro 13, lo que nos indica que además del pulmón es un órgano

que también puede verse afectado por esta bacteria. El que no se encontrara asociación entre el grado de lesión y los resultados moleculares, para DVB, Leptospirosis y Neosporosis, podría indicar que la severidad de las lesiones no es un factor que determine la presencia o ausencia de estos tres agentes infecciosos, como en el caso de *Neospora caninum*, la distribución de las lesiones es aleatoria, para Leptospirosis debido a los altos títulos obtenidos por MAT se puede pensar que hubo infecciones sobreagudas donde los estados febriles pudieron ocasionar el aborto (Javier y col.,2016) y en el caso de DVB, la etapa de la gestación en que se dé la infección y el biotipo viral, podría influir en la detección de lesiones (Brodersen, 2014; Lanvon y col., 2014). Lo antes mencionado son elementos a considerar ya que bajo estas condiciones podría no detectarse el DNA o RNA en las pruebas moleculares.

Para DVB no se encontró asociación entre la serología y las pruebas moleculares, al respecto, estudios en becerros y bovinos adultos han demostrado que individuos que tuvieron una infección aguda serán positivos para anticuerpos y negativos para el antígeno. Los persistentemente infectados serán negativos para anticuerpos y positivos para la detección del antígeno y aislamiento viral. (Lanyon y col., 2014). Esto puede explicar en parte los resultados en los individuos seropositivos o seronegativos hallados en este estudio como se observa en el Cuadro 7. La viremia en individuos no gestantes y no inmunes se presenta a los tres días post-infección, sin embargo, la inmunidad contra este agente suele desarrollarse dos semanas después de la infección.

El diagnóstico presuntivo por estudio histopatológico emitido para IBR, DVB, Leptospirosis, Neosporosis y Brucelosis en los órganos de los fetos no fue estadísticamente significativo ($P > 0.05$) con los resultados de serología en las madres. En el caso de Neosporosis, esto puede explicarse porque la detección de anticuerpos puede ser positiva en animales que estuvieron expuestos al agente sin que necesariamente presenten el aborto o en caso de que se presente, la carga parasitaria podría haber sido baja y no provocar lesiones detectables por histopatología además de no poder ser detectado por PCR (Sánchez y col., 2009). También pueden detectarse anticuerpos anti-*Neospora caninum* en becerros pre-calostrados que nacieron aparentemente sanos (PI) y en animales que adquirieron la parasitosis por ingestión de ooquistes esporulados del parásito (vía horizontal). Para IBR la seropositividad puede observarse en individuos enfermos, vacunados recientemente, activación del virus latente en nervio trigémino y caudal por factores estresantes (vacunados con virus vivo modificado, o individuos que se han recuperado de una infección aguda). En el caso de DVB, se ha observado que individuos PI son serológicamente negativos debido a que presentan tolerancia inmunológica (Gamlén y col., 2010). Además la detección de anticuerpos se da en individuos recientemente vacunados. Por otro lado, hay que tomar en cuenta que el desarrollo de inmunidad se da dos semanas después de la infección, concluyendo que la presencia o ausencia de anticuerpos en las vacas no confirma la presencia de infección en el feto. En el caso de Brucelosis las pruebas de Rosa de bengala y Rivanol son capaces de diferenciar entre animales vacunados de infectados. En los fetos pueden no encontrarse lesiones debido a que la bacteria tiene tropismo por los trofoblastos en la placenta durante el inicio de la infección, desencadenando el aborto por

estrés e hipoxia fetal, en algunos informes se ha mencionado que los falsos positivos son resultado de revacunaciones con la cepa 19 (Sánchez y col., 2000), El empleo de la vacuna RB51 en vacas gestantes en pocos casos ha demostrado inducir el aborto (Wareth y col 2016). En el caso de Leptospirosis, algunos estudios hechos por Mahajan (2013), refieren que el punto de corte para determinar animales seropositivos o seronegativos (OIE, 1992) en la prueba de MAT, es poco confiable debido a la subjetividad de la interpretación, ya que hay falta de precisión de acuerdo al valor dado en el grado de titulación. Además puede haber falsos positivos debido a la reacción cruzada entre serovariedades. Otro dato importante a considerar con respecto a *L. hardjo*, es que esta serovariedad es capaz de producir títulos bajos pero alta tasa de eliminación en la orina, conduciendo a falsos negativos además de ser hospedada permanente en el bovino. Aunque el criterio de la OIE, 1992 fue empleado en este estudio (Cuadro 5), hay títulos de hasta 6400, lo que sugiere un cuadro agudo de la enfermedad con la posibilidad de no producir lesiones en los órganos fetales.

No hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre el diagnóstico presuntivo por histopatología y los resultados de las pruebas moleculares para DVB, Neosporosis, Leptospirosis y Brucelosis, por lo tanto, no están asociados. Para DVB la positividad por PCR-RT en los fetos podría deberse a la vacunación con virus vivo modificado en algunos casos en las vacas (Kovács y col., 2002). La presencia o ausencia de lesiones en los fetos como se mencionó anteriormente, dependerá del momento de infección ya que si se da antes del desarrollo inmunológico del feto es decir antes de los 100-125 días habrá inmunotolerancia y no se encontrarán lesiones, y los becerros serán PI al nacer si es que no hubo muerte fetal o reabsorción embrionario o algún efecto

teratogénico. Para Neosporosis en los casos en que se observó positividad por PCR pero no se observaron lesiones que sugirieran la presencia del parásito en el estudio histopatológico, algunos autores refieren que en la transmisión vertical del parásito este puede conducir a la muerte fetal antes de que las lesiones se desarrollen en el feto (Cabral y col. 2009, Sondgen y col., 2001), otra explicación es que, los taquizoítos o quistes de *N. caninum* rara vez se presentan en número suficiente para poder ser vistos en todas las secciones histológicas de los órganos de un animal, por ello se sugiere el uso de pruebas sensibles y específicas para detectar al parásito, por esta razón, la histopatología debería interpretarse en un contexto complementario con otras pruebas como inmunohistoquímica, PCR, u otras técnicas que permitan la identificación del agente. En casos contrarios en que se observaron lesiones sugerentes de Neosporosis pero fueron negativos por PCR, pudieran estar interviniendo múltiples factores como técnicas en el muestreo del tejido, es decir los fragmentos que fueron tomados y separados uno para histopatología y otro para análisis molecular, el parásito podría haber estado presente en una sección pero no en la otra, la cantidad de antígenos parasitarios pudo haber sido baja, o que el DNA del parásito estuviera degradado por autólisis (Cabral y col., 2009). En caso de Leptospirosis, Otaka y col. (2012), identificaron la presencia de esta bacteria como agente causal del aborto por PCR empleando los jugos gástricos del feto lo que no ocurrió cuando intentaron identificarlo en hígado y riñón de esos mismos fetos. Aunque en este estudio se observaron órganos con lesiones sugerentes de una infección por leptospirosis, fueron negativos en PCR, por lo que debe tenerse en cuenta incluir el líquido gástrico en las muestras remitidas al laboratorio para descartar la presencia de *Leptospira*, ya que al parecer el DNA

de la bacteria puede estar mejor conservado. En caso contrario en que no se sospechó por estudio histopatológico la presencia de *Leptospira*, pero se encontró DNA bacteriano, se ha hecho mención que el aborto también puede ser resultado de una presentación sobreaguda de la enfermedad debido a una pirexia mantenida en las vacas preñadas, donde se ha visto implicadas a serovariedades no adaptadas como *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae* y *autumnalis*, por lo que no aparecen estados de portador crónico. (Javier y col., 2016) (Cuadro 5). Para Brucelosis en los casos donde se sospechó de una infección en el estudio histopatológico, pero no se encontró positividad en el PCR puede explicarse por factores inhibitorios en la reacción del PCR (Buyukcangaz y col., 2011); y los casos donde se encontró positividad en el PCR pero no se observaron lesiones en el estudio histopatológico se sugiere que el tropismo de esta bacteria por la placenta pudo desencadenar el aborto antes de producir lesiones en el feto (Anderson y col., 2007). Además Mittal (2018), durante su estudio observó que el PCR positivo se presentó más en el tejido placentario en lugar de sangre del corazón del feto o contenido del estómago del feto.

Para el diagnóstico integral de IBR, el estudio Histopatológico y PCR demostraron tener mayor asertividad que la serología, esto puede deberse a que en este estudio la mayoría de las vacas estaban vacunadas ya que la reactivación en latencia por el uso de VVM pudieron modificar el panorama real de la infección, pero los hallazgos patológicos encontrados concuerdan con las lesiones producidas por este agente. En el caso de DVB la serología y PCR-RT, se demostró tener concordancia con el diagnóstico integral, sin embargo, es importante contar con la información de la vacunación para descartar falsos

positivos por PCR-RT, y datos serológicos del hato en general, así como el empleo de identificación del antígeno y descartar los PI. En cuanto al diagnóstico de Neosporosis se recomienda emplear PCR y Serología ya que ambas pruebas tuvieron concordancia altamente significativa con el diagnóstico integral. En el caso de la serología teniendo en cuenta que ninguna de las vacas fue vacunada, la serología fue capaz de distinguir a las vacas infectadas de las no infectadas. En el caso de PCR también demostró ser una técnica muy útil para el diagnóstico de este parásito. Para Leptospirosis, MAT demostró ser una de las pruebas más útiles en el diagnóstico de aborto bovino ocasionado por *Leptospira*, esto puede deberse a los altos títulos observados en este estudio. Aun así, debe considerarse a la histopatología como prueba inicial además de considerar a los resultados positivos por PCR ya que podrían aportar información valiosa en caso de hallar DNA bacteriano de este agente. En el caso de Brucelosis PCR y la serología tuvieron concordancia con el diagnóstico integral por lo que deben considerarse dentro, ya que el PCR es una técnica sensible (Wareth y col., 2015). y la serología es capaz de distinguir entre las vacunadas y las infectadas.

Un criterio empleado en este estudio para que *Leptospira spp* fuese incluida como responsable de aborto es que la madre que abortó el feto fuera positiva a una o más, serovariedades entre las que afectan de forma común al bovino, cabe resaltar que los títulos obtenidos en este estudio fueron de hasta 6400 (Cuadro 5). El historial de vacunación fue tomado en cuenta, y se contrastó con los resultados de las pruebas moleculares, serología y estudio histopatológico. La vacunación con virus vivo modificado (VVM) de DVB ha demostrado ser eficiente contra la infección de *Pestivirus*, además de ser económica, por ser de una sola aplicación, requiriendo el mínimo manejo y la respuesta inmune se da de forma

rápida a las 4 semanas, aunque también ha tenido efectos adversos como: desencadenar el aborto, infección fetal, inmunosupresión o signos respiratorios. Es por ello que los fetos que hayan sido positivos por PCR-RT para este agente pero negativos en las otras pruebas, se puede descartar una infección natural. (Kovács y col., 2002).

A continuación, se discutirán los diagnósticos integrales solo en algunos fetos y particularidades de él o los agentes infecciosos involucrados.

Para IBR, en el caso del feto 2 aunque se obtuvo seropositividad en la madre (Cuadro 7) y PCR positivo en órganos fetales (Cuadro 4), para este agente, no se consideró que estuviera involucrado en el aborto, debido a que la vaca estaba vacunada (Cuadro 9), además de que el feto no presentó lesiones características de infección por este agente (Cuadro 1). En el feto 3, no se detectaron lesiones características de IBR (Cuadro 1) además de ser negativo por PCR (Cuadro 4), la serología pudo ser positiva (Cuadro 7) en la madre porque ésta fue vacunada contra este virus (Cuadro 9). En el feto 4 se consideró que Herpesvirus tipo 1 pudo estar involucrado en el aborto ya que se encontraron lesiones sugerentes contra este agente (Cuadro 1) y la vaca fue seropositiva (Cuadro 7). En este feto el PCR puede ser resultado de un falso negativo, por razones que se han descrito con anterioridad (Cuadro 4). En el feto 6, la madre fue seropositiva (Cuadro 7) y el PCR fue positivo en los órganos del feto (Cuadro 4) aunque las lesiones fueron inespecíficas (Cuadro 1), sin embargo, las hemorragias encontradas en el riñón se inclinan más a pensar en una infección por este agente, debido al tropismo por vasos sanguíneos. En el caso de los fetos 7 y 8 solo existió positividad por la técnica de PCR (Cuadro 4), que puede explicarse por empleo de VVM en la vacunación aunque se desconoce cuándo fue aplicada, por lo que no se atribuyó

el aborto a este virus. En el caso de los fetos 9, 10, 12, 13, 17, 19 y 20 los órganos fetales por medio de la técnica de PCR fueron positivos a este agente (Cuadro 4), y se consideró que pudo estar involucrado en el aborto debido a las lesiones halladas en la Histopatología (Cuadro 1). Aunque las madres estaban inmunizadas contra este agente, el hecho de que no se les detectaran anticuerpos podría deberse al tiempo de la inmunización el cual se desconoce o a una deficiente inmunización.

Para DVB en los fetos 1, 4, 10, 14 y 17 aunque se observaron lesiones que sugirieran la infección por este agente (Cuadro 1) no se encontró positividad en los órganos fetales por PCR-RT (Cuadro 4) ni seropositividad en las madres (Cuadro 7) que apoyaran la infección con este agente, por lo que se descartó en el diagnóstico integral. En el caso de los fetos 3, 6 y 9 no se consideró que DVB estuviera involucrado en aborto ya que solo existió positividad por PCR en los órganos fetales por lo que esta positividad se pudo atribuir a la vacunación (Cuadro 9). Para el feto 12 se consideró que este agente pudo estar involucrado porque la madre fue seropositiva (Cuadro 7) y por PCR-RT los órganos fetales fueron positivos (Cuadro 4), aunque no se observaron lesiones sugerentes, esto podría explicarse por el estado o etapa de infección por este virus (Cuadro 1). Para los fetos 13 y 16 aunque las madres hayan sido seropositivas (posiblemente por la vacunación) (Cuadro 7), no existió evidencia de que el agente estuviera presente en el feto por PCR-RT (Cuadro 4) o lesiones que sugirieran su presencia (Cuadro 1). En el feto 15 la madre fue seropositiva (Cuadro 7), pero como se desconoce si hay o no vacunación contra este virus (Cuadro 9), puede atribuirse a la inmunización vacunal ya que en el PCR no se observó positividad en algún órgano del feto (Cuadro 4), con respecto a las lesiones encontradas por

estudio histopatológico (Cuadro 1) también se consideró la participación de otros agentes como IBR debido a la similitud de lesiones con respecto al virus de DVB. En el feto 19 los órganos fetales fueron positivos a DVB por PCR-RT (Cuadro 4) además se encontraron lesiones en el estudio histopatológico (Cuadro 1), que sugirieron la presencia de este agente por ello se infirió que este virus pudo estar involucrado en el aborto. La no detección de anticuerpos en la madre sugiere que esta sea PI o una inadecuada inmunización (Cuadro 7).

Para Neosporosis en el feto 1, 5, 8 y 12 se encontró que las madres fueron seropositivas (Cuadro 7) cabe mencionar que no se vacuna contra este agente, y también se encontraron lesiones (Cuadro 1) que sugirieron la presencia de este parásito por lo que se sospechó de la participación de este en el aborto. En lo que respecta al PCR no se encontró positividad posiblemente debido al muestreo aleatorio de los tejidos y la poca cantidad de protozoarios (Cuadro 4). En los fetos 2, 9, 10 aunque se hallaron lesiones (Cuadro 1) que sugirieran la presencia de este parásito no se encontró evidencia por serología (Cuadro 7) o PCR (Cuadro 4) que respaldara que este agente estuvo involucrado por lo que descartó del diagnóstico integral. En el feto 4 la madre fue seropositiva (Cuadro 7) y los órganos fetales fueron positivos en la técnica de PCR a este protozooario (Cuadro 4) por lo que se consideró que estuvo involucrado en el aborto. La ausencia de lesiones en este feto (Cuadro 1), como ya se ha mencionada puede atribuirse a que la muestra procesada no fue representativa, es decir no presentaba lesiones ni parásitos o también a que el aborto se produjo antes de causar lesiones en el feto. Por otro lado, la visualización de los protozoarios especialmente los taquizoítos, no siempre es posible con la tinción de rutina Hematoxilina y Eosina. En el feto 13 se infirió que este agente estuvo involucrado

porque los órganos fetales fueron positivos (Cuadro 4) y concuerda con las lesiones encontradas en el estudio histopatológico (Cuadro 1) aunque la madre fue seronegativa posiblemente debido a la baja cantidad de anticuerpos. (Cuadro 7). En los fetos 16, 17 y 20 las madres fueron seropositivas (Cuadro 7) por lo que se consideró que este agente pudo estar involucrado en el aborto ya que no se vacuna contra este protozooario. La ausencia de lesiones por histopatología (Cuadro 1) y el PCR negativo (Cuadro 4), pueden indicar una infección aguda por este agente antes de producir lesiones en el feto y en el caso de PCR pudiera atribuirse a la poca cantidad de protozoarios presentes en las muestras.

Para Brucelosis en el feto 1 solo se encontró seropositividad en la madre (Cuadro 8). Debido a que no se conoce el historial de vacunación (Cuadro 9), se sugiere un falso positivo, mismo que se ha observado por revacunaciones con la Cepa S19, además de que la técnica de PCR fue negativa en los órganos fetales (Cuadro 4) y el estudio en el histopatológico no se observaron lesiones sugerentes de una infección por esta bacteria (Cuadro 1) por lo que no se consideró que estuviese involucrada en el aborto. En el feto 4 debido a que los órganos fetales fueron positivos en PCR para esta bacteria (Cuadro 4), se encontraron lesiones sugerentes en el estudio histopatológico (Cuadro 1) y que la madre no había sido inmunizada, se consideró que esta bacteria estuvo involucrada en el aborto (Cuadro 8). En los fetos 5 y 8 solo en la prueba de PCR se encontró positividad en los órganos (Cuadro 4), en lo que respecta al estudio histopatológico, las lesiones pudieron estar ausentes por el tropismo de la bacteria por la placenta desencadenando el aborto por hipoxia fetal (Cuadro 1). La seronegatividad (Cuadro 8) se puede explicar porque la inmunización no fue aplicada correctamente (Cuadro 9). En los fetos 10, 17 y 20 sus madres no

fueron vacunadas contra esta bacteria (Cuadro 9) además fueron seropositivas (Cuadro 8) y en el estudio histopatológico se observaron lesiones sugerentes de esta infección (Cuadro 1) por lo que se consideró que estuvo involucrada en el aborto. Que los órganos fetales hayan salido negativos por PCR (Cuadro 4) pueden ser por efectos inhibitorios en la prueba. En los fetos 11, 13, 15, sus madres fueron seropositivas (Cuadro 8), solo del feto 11 se conoce que su madre no fue inmunizada y las madres de los fetos 13 y 15 se desconoce el historial de vacunación (Cuadro 9). Los órganos de estos fetos en la técnica de PCR fueron positivos (Cuadro 4) por lo que se consideró que este agente estuvo involucrado en el aborto. La ausencia de lesiones en el estudio histopatológico (Cuadro 1) en los fetos puede explicarse por daño directo a la placenta provocando hipoxia fetal desencadenado el aborto antes de que las bacterias produzcan lesiones. En los fetos 12, 14, 18 y 19 de las tres pruebas diagnósticas solo se observó seropositividad (Cuadro 8) en las madres, sin embargo, se consideró que esta bacteria pudiera estar involucrada en los abortos ya que las pruebas serológicas distinguen animales vacunados de los infectados. En el caso del feto 12 era la única madre en la que no se vacunaba contra este agente (Cuadro 9) en los otros fetos las madres si fueron vacunadas. La ausencia de positividad en la técnica de PCR (Cuadro 4) y de lesiones en estudio histopatológico (Cuadro 1) pudieran indicar una infección aguda.

En el caso de Lesptospirosis los fetos 2, 3 y 13 sus madres fueron seropositivas (Cuadro 5) y en los órganos fetales por la técnica de PCR se encontró positividad (Cuadro 4) por lo que se consideró que la bacteria estuviera involucrada en el aborto. La ausencia de lesiones (Cuadro 1) puede explicarse por una infección híper-aguda (hipertermia en la madre). En el caso de los fetos 6, 8, 16 y 18, de

los tres métodos empleados, solo se encontró que las madres fueron seropositivas (Cuadro 5). Debido a los altos títulos de anticuerpos obtenidos, se consideró que esta bacteria estuvo involucrada en el aborto. El que las pruebas de PCR sean negativas (Cuadro 4) puede explicarse por efectos inhibitorios en la prueba (degradación DNA, contaminación). Con lo que respecta a las lesiones, el aborto pudo ser consecuencia de una hipertermia en la vaca no dando tiempo para el desarrollo de lesiones en el feto (Cuadro 1). La madre del feto 10 fue seropositiva (Cuadro 5) y el feto presentó lesiones sugerentes para *Leptospira* (Cuadro 1), pero se descartó que estuviese involucrada en el aborto debido a que los títulos no eran tan altos como los observados en las madres de otros fetos, y a que en la PCR no se encontró positividad a la bacteria (Cuadro 4). Los fetos 13 y 17 sus madres fueron seropositivas (Cuadro 5) y los órganos fetales fueron positivos en la técnica de PCR (Cuadro 4) para esta bacteria por lo que se consideró que estuvo involucrada en el aborto. La ausencia de lesiones (Cuadro 1) puede deberse a que no siempre se presentan sugiriendo una infección aguda. Para el feto 15 no se consideró que esta bacteria estuviera involucrada en el aborto ya que solo se observaron lesiones que sugirieron la infección por este agente, aunque también pudieron ser provocadas por otra bacteria (Cuadro 1) además de que el PCR (Cuadro 4) y la serología fueron negativos (Cuadro 5). Para el feto 20 se consideró que esta bacteria estuvo involucrada porque la madre fue seropositiva con altos títulos (Cuadro 5) y porque el feto presentó lesiones sugerentes para este agente. (Cuadro 1). El PCR pudo ser negativo por efectos inhibitorios en la reacción (Cuadro 4).

Aunque es difícil conocer cuál agente fue el desencadenante del aborto, se encontró evidencia de que más de un agente estuvo involucrado en el mismo.

La mayoría de los abortos se presentó en el tercer tercio (65%), seguido del segundo tercio (35%). Mark (2007), menciona que los abortos de origen infeccioso se presentan frecuentemente desde la mitad hasta el final de la gestación lo que concuerda con los agentes identificados en el presente estudio (Cuadro 25).

Para IBR, 14 vacas presentaron el aborto entre el segundo y tercer tercio, y concuerda con lo reportado en la literatura, que menciona que el aborto puede presentarse principalmente entre los 4 y 8 meses de gestación. (Mark. 2007, Schalafer y col., 2016, Cabell. 2014). En el caso de DVB solo hubo 4 vacas que presentaron el aborto en el tercer tercio de gestación. Para esta enfermedad se ha descrito que los efectos en el feto van a depender de la edad en que el feto sea infectado, si la viremia en la madre se produce entre el día 29 y 41 post-concepción puede dar lugar a la muerte embrionaria, si la infección se presenta después del día 30 de la gestación y el primer tercio de la gestación puede dar lugar al nacimiento de becerros PI (persistentemente infectados). Si la infección ocurre entre los 80-150 días de gestación el feto puede desarrollar hipoplasia cerebelar, degeneración ocular, pseudoquistes en el cerebro y timo, braquignatia, o hipoplasia pulmonar (Lanyon y col., 2013). En este estudio se sugiere que los fetos pudieron haberse infectado en el primer tercio de gestación. Para Brucelosis, 16 vacas tuvieron el aborto en el segundo y tercer tercio de gestación, la literatura menciona que el aborto puede presentarse a partir del 5 mes, lo que concuerda con lo observado en este estudio. (Mark. 2007, Cabell. 2014). Para Leptospirosis la literatura menciona que el aborto es frecuente a partir del sexto mes o último tercio de la gestación, 11 vacas presentaron el aborto en el último tercio. Con respecto a las que tuvieron el aborto en el segundo tercio fue a partir

del 6 mes, solo 2 vacas lo presentaron entre 5.4 y 5.6 meses muy cercano al sexto mes. (Mark. 2007, Cabell. 2014). Para Neosporosis, 13 vacas presentaron el aborto en el segundo y tercer tercio de gestación, con respecto a esto la literatura menciona que el aborto por Neosporosis se presenta principalmente entre el tercero y octavo mes de gestación. (Mark. 2007, Cabell. 2014).

Existen varios estudios de serología que han permitido identificar la asociación seropositiva de más de un agente infeccioso involucrado en el aborto bovino (Santos y col. 2005). (Cortez y col. 2006). Sin embargo, en este estudio no se comprobó que hubiese correlación estadística entre agentes infecciosos ($P > 0.05$), esto puede deberse a que se contó con más información como: el historial de vacunación, la serología de las madres, histopatología de los fetos y el PCR de los mismos, despejando las incógnitas que puede generar el empleo de una sola técnica diagnóstica.

10. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados estadísticos, el empleo de cualquier órgano como corazón, pulmón, hígado, riñón o cerebro es igualmente útil para la detección de *Herpes virus tipo 1*, *Flavivirus*, *Brucella abortus*, *Leptospira* y *Neospora caninum*, por medio de la técnica PCR y su variante PCR-RT punto final.

Se detectó a más de un agente infeccioso involucrado en el aborto bovino, y la completa información de los registros a detalle puede contribuir a la interpretación de las causas de los abortos.

Los abortos se presentaron de forma más frecuente en el segundo y tercer tercio de gestación (100%).

Si se encuentran lesiones sugerentes por estudio histopatológico de una infección por IBR es muy probable que el feto este infectado, siendo una prueba de gran utilidad útil para su diagnóstico en conjunto con el PCR.

Para DVB, Neosporosis y Brucelosis, las pruebas de serología y moleculares demostraron tener la mejor asertividad para detectar a individuos infectados tanto madres como fetos.

En el caso de Leptospirosis la prueba de MAT demostró ser la mejor prueba para el diagnóstico de esta enfermedad.

Se encuentran lesiones sugerentes de Neosporosis por histología en cerebro es muy probable que sean positivas por PCR.

Para IBR, la severidad de la lesión en cerebro tiene asociación con los resultados de PCR.

Para Brucelosis, el grado de lesión por histología en hígado está asociado con los resultados por PCR.

Para Leptospirosis, Neosporosis y DVB no existe asociación entre el grado de lesión encontrada por histología en corazón, pulmón, hígado, riñón y cerebro con los resultados en PCR.

Hay asociación para IBR entre el PCR y el estudio histopatológico.

Para IBR el estudio histopatológico y el PCR tuvieron concordancia con el diagnóstico integral.

Aunque se comprobó que el aborto esta ocasionado por más de un agente infeccioso en el 90% de los casos, no existió significancia estadística que evidenciara una correlación entre los agentes infecciosos.

De acuerdo a los resultados de este estudio, se recomienda que el diagnóstico sea integral tomando en cuenta más de un método diagnóstico para tener mayor panorama de los agentes realmente involucrados en los abortos.

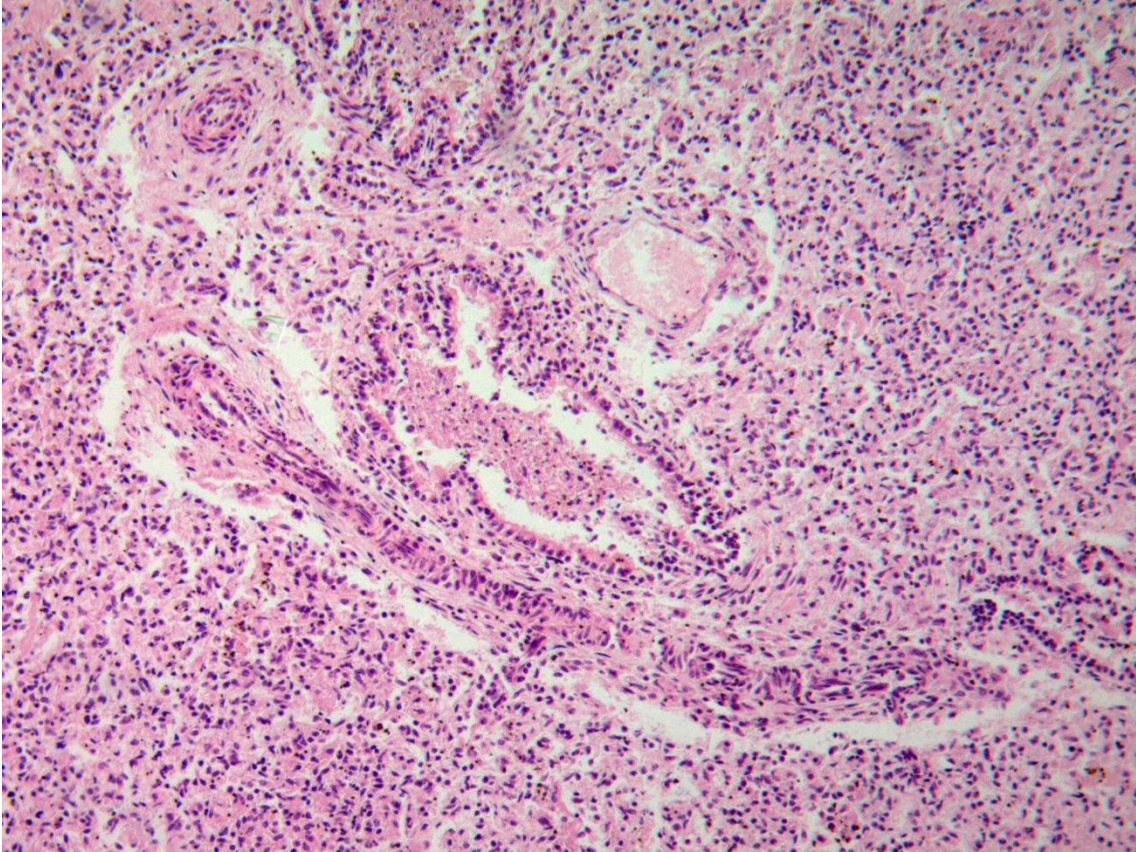


Figura 2. H.E. 40x. Sección de pulmón. Se observan moderados restos necróticos en la luz del bronquiolo Feto 12.

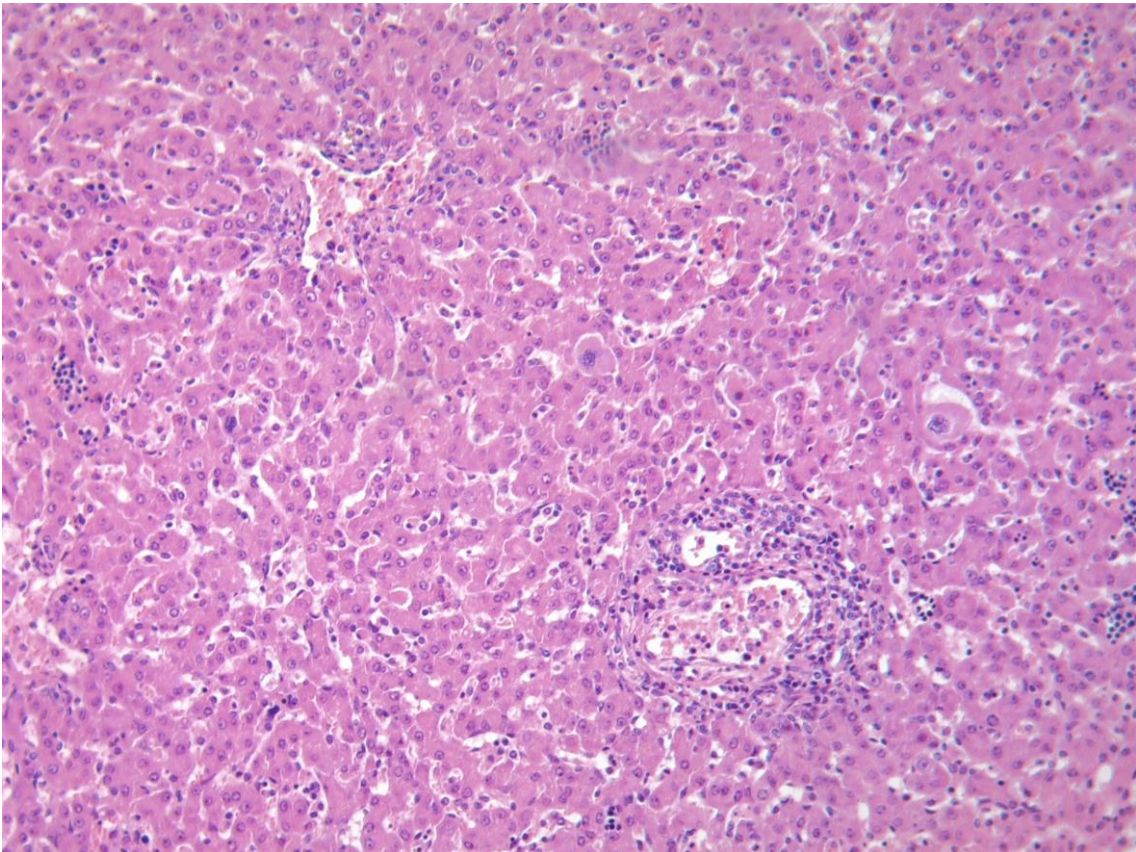


Figura 3. H.E 4X. Sección de hígado. Se observa infiltrado linfoplasmocítico peri portal. Feto 11.

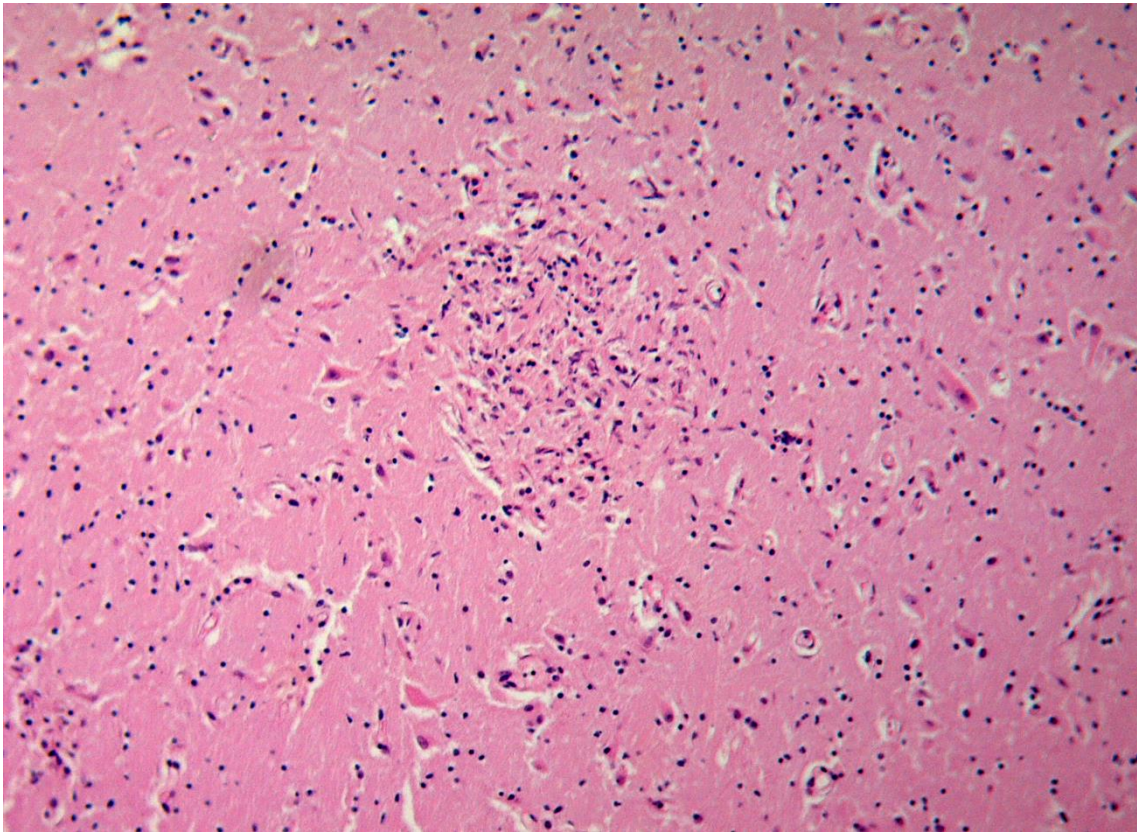


Figura 4. H.E. 40x. Sección de cerebro. Se observa un foco de gliosis y necrosis. Feto 3.

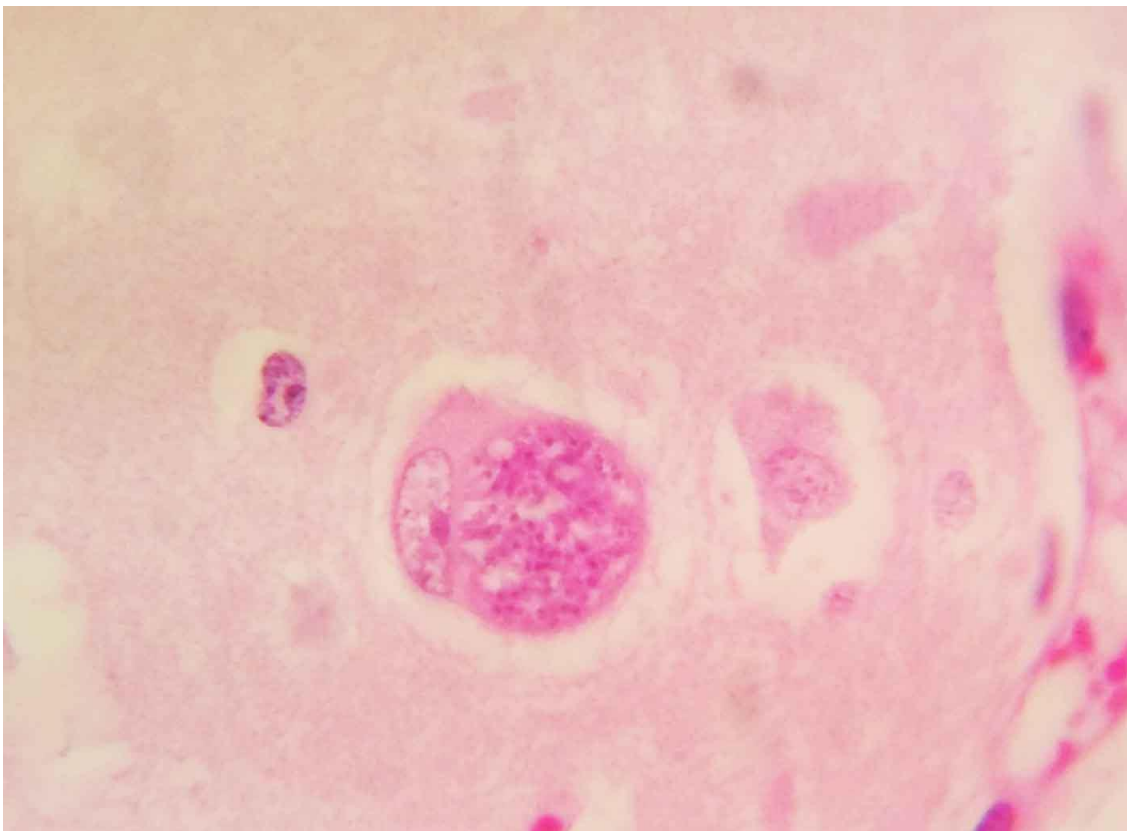


Figura 5. H.E. 100X. Sección de cerebro. Se observa un quiste intracitoplasmático en una neurona que desplaza el núcleo a la periferia. Feto 3.

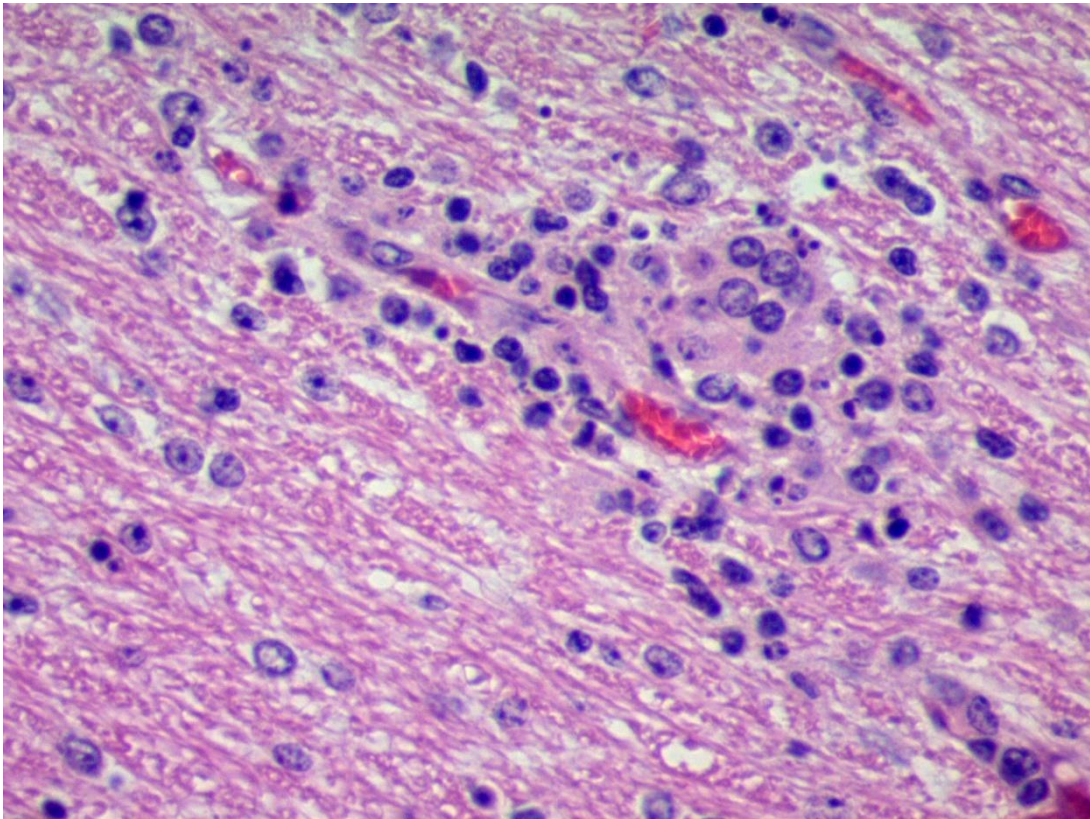


Figura 6. H.E. 40 X. Sección de Cerebro. Se observa perivascularitis linfoplasmocítica y necrosis. Feto 14.

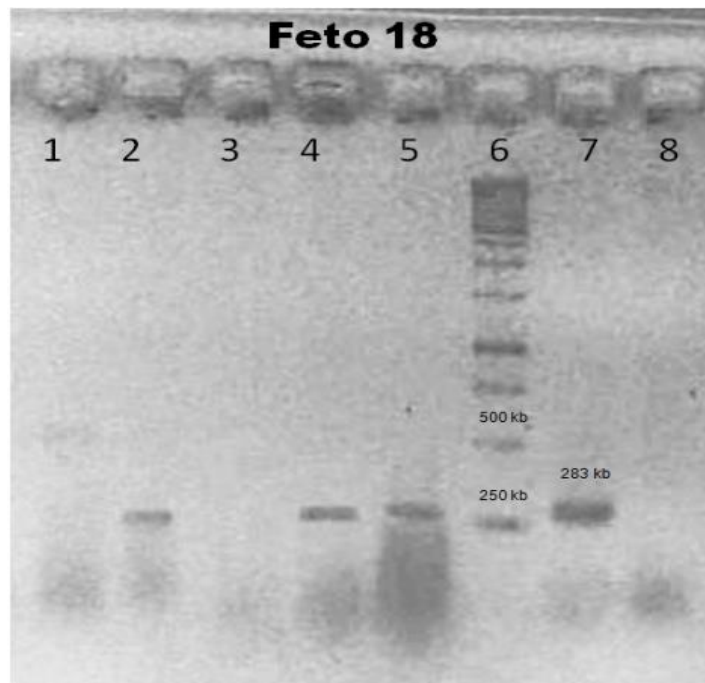


Figura 7. Gel de agarosa 1% PCR-RT DVB de los órganos del feto 18. Teñido con bromuro de etidio. 1=Corazón, 2=Pulmón positivo a DVB, 3=Hígado, 4=Riñón positivo a DVB, 5=Cerebro positivo a DVB, 6=Cargador de peso molecular 1kb, 7=Testigo positivo y 8=Testigo Negativo.

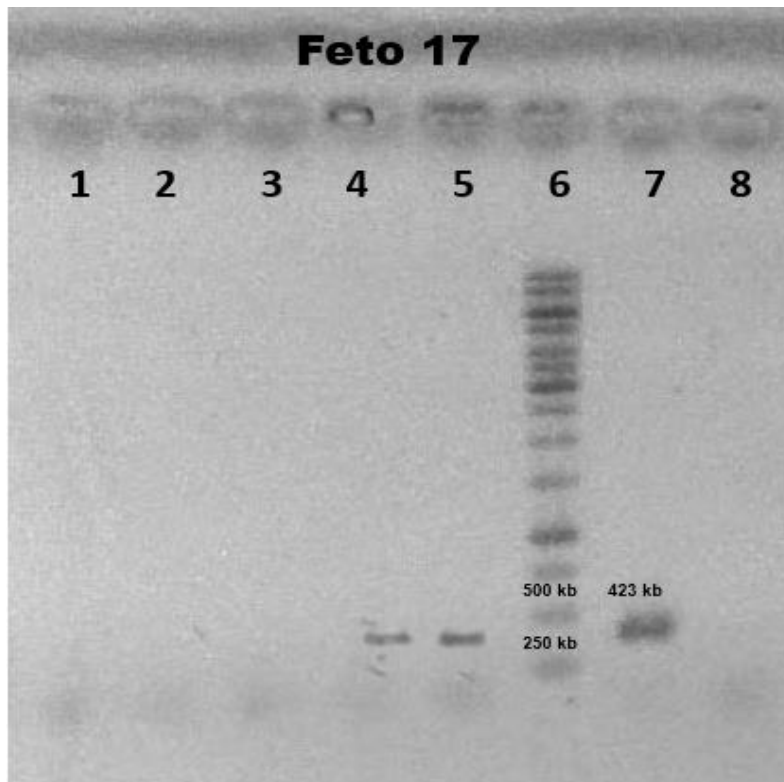


Figura 8. Gel de agarosa 1% PCR *Leptospira sp.* de los órganos del feto 17. Teñido con bromuro de etidio. 1=Corazón, 2=Pulmón, 3=Hígado, 4=Riñón positivo a *Leptospira sp.*, 5=Cerebro *Leptospira sp.*, 6=Cargador de peso molecular 1kb, 7=Testigo positivo y 8=Testigo Negativo

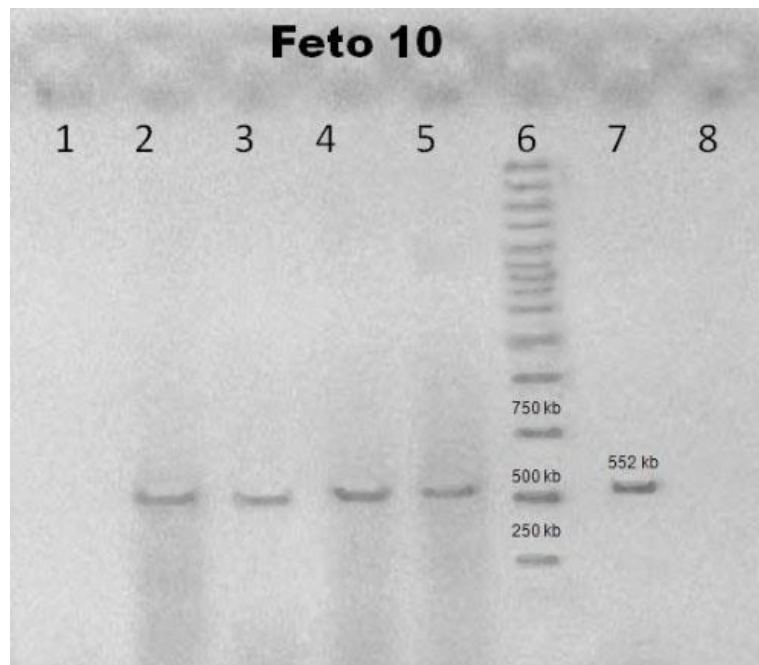


Figura 9. Gel de agarosa 1% PCR IBR de los órganos del feto 10. Teñido con bromuro de etidio. 1=Corazón, 2=Pulmón, 3=Hígado, 4=Riñón positivo a *Leptospira sp.*, 5=Cerebro *Leptospira sp.*, 6=Cargador de peso molecular 1kb, 7=Testigo positivo y 8=Testigo Negativo.

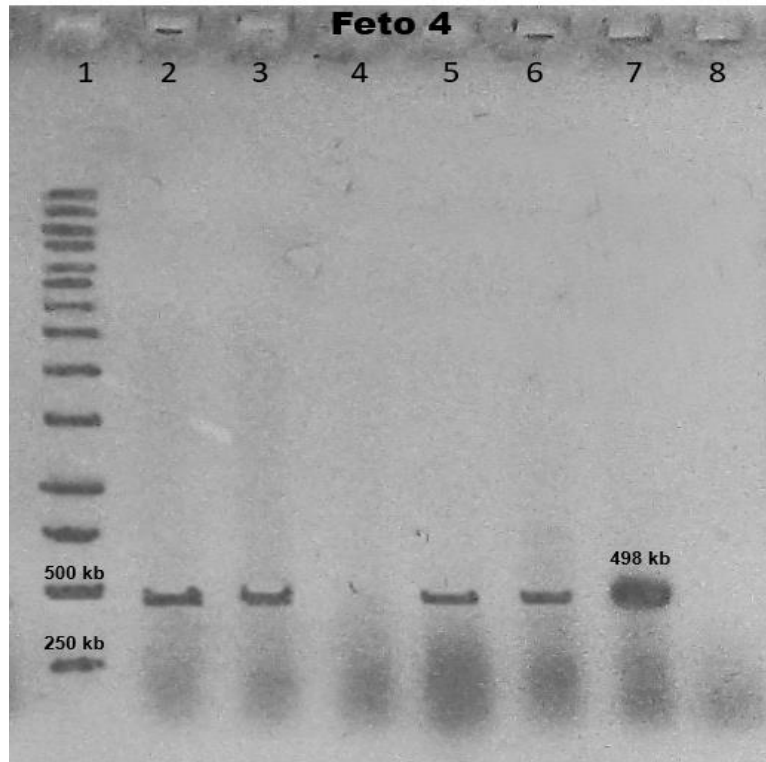


Figura 10. Gel de agarosa 1% PCR *Brucella abortus* de los órganos del feto 4. Teñido con bromuro de etidio. 1=Cargador de peso molecular 1kb 2=Corazón positivo, 3=Pulmón positivo, 4=Hígado, 5=Riñón positivo, 6=Cerebro positivo, 7=Testigo positivo y 8=Testigo Negativo

APENDICE 1

Solución D lisis

4M Tiocianato de guanidina

25Nm Citrato de sodio

0.5% Sarcosyl

0.1 M 2 mercaptoetanol

11. LITERATURA CITADA

Allardent-Servent A., Bourg G., Ramuz M., Pages M., Bellis M., Roizes G. (1988). DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *Journal of Bacteriology*, 170 (10): 4603-4607.

Alonso-Andicoberry C, García Peña FJ, Ortega-Mora LM. 2001. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptispirosis bovina, revisión. *Invest. Agr: Prod. Sanid. Anim*, 16 (2)

Anderson ML. 2007. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology*, 68 (3): 474-486.

Arreola-Camberos S, García-Márquez LJ, Macedo-Barragan R, Morales-Salinas E, Figueroa-Chávez D. 2012. Risk factors and seroprevalence against *Neospora caninum* in dual-purpose and beef cattle in Colima, México. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11(14): 2440-2144.

Ávila GJ, Cruz HGE. 2007. Enfermedades abortivas. Clínica de bovinos 1. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 1-8.

Ben A, De la Peña A, & Moctezuma. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Journal of Biological Education*, 140, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>

Björkman C, Duong MC, Alenius S, Huong LTT. Prevalence of *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in Southern Vietnam. *The Veterinary Journal* 2008;175:390–394

Blood, D.C, Henderson J.A, O.M. Rodositis. *Medicina Veterinaria*, ed. Interamericana: México 1993. Pp 522-31.

Boletín sobre el sector lechero, Lactodata. Disponible en: http://www.lactodata.info/docs/ind/lacto_ind_prod.pdf

Brodersen BW. 2014. Bovine viral diarrhoea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Veterinary Pathology* 51 (2): 453-464.

Buyukcangaz, E., Sen, A., Carli, K. T., & Kahya, S. (2011). Papers Comparison of direct culture versus PCR for the detection of *Brucella* in aborted fetuses of cattle and sheep in Turkey, 1. <https://doi.org/10.1136/vr.c7003>

C. L. Kellingi, I. A. Schipper, G. E. Strum, R. B. Carlson, J. E. T. (1973). Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) abortion observations on incidence in vaccinated and non-vaccinated and exposed cattle. *Cornell Vet.*, 63, 383–389.

Cabral, A. D., Camargo, C. N., Thiers, N., Galletti, C., & Okuda, L. H. (2009). Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR, 14–19. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01804003>

Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Veterinary Research Communications* 27(5): 359-369.

Cárdenas, B., Arango, J., Carlos, J., Maya, M., Juan, J., Hirose, M., & Bernal, O. (2006). Comparación de tres pruebas diagnósticas para el aborto Comparison between three diagnostic tests to detect.

Carmona-Gasca CA, León LL, Castillo-Sánchez LO, Ramírez-Ortega JM, Ko A, Palomera CL, de la Peña-Moctezuma A. 2011. Detection of *Leptospira santarosai* and *L. kirschneri* in cattle: new isolates with potential impact in bovine production and public health. *Veterinaria México* 42 (4):277-278.

Castro H.A, González S.R, Prat M.I.2005. Brucellosis: Una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 39(2): 203-216.

Castro, H. A., González, S. R., & Prat, M. I. (2005). Inmunología Actualización Brucellosis: una revisión práctica*. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 39(2), 203–216.

Chase, C. C. L., Fulton, R. W., O'Toole, D., Gillette, B., Daly, R. F., Perry, G., & Clement, T. (2017). Bovine herpesvirus 1 modified live virus vaccines for cattle reproduction: Balancing protection with undesired effects. *Veterinary Microbiology*, 206(2016), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.016>

Comité Técnico sobre aborto bovino en la Comarca Lagunera. Boletín técnico, No. 01, 1998.

Corbel MJ, Elberg SS, Cosivi O. 2006. Brucellosis in humans and animals. Geneva. World Health Organization. Switzerland. Disponible en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>

Cortez A., Castro A.M.G., Heinemann M.B., Soares R.M., Leite R.C. , Scarcelli E., Genovez M.E., Alfieri A.A., Richtzenhain L.J. 2006. Detecção de ácidos nucléicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvirus bovino e virus da diarreia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58(.6);1226-1228.

De Aluja SA, Constantino CF. 2002. Técnica de necropsias en animales domésticos. 2ª Ed., Editorial El Manual Moderno, S.A de C.V. México, D.F.

De Vries A. 2006. Economic value of pregnancy in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 89 (10):3876-3885.

Díaz A. E. 2013 Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en Animales Domésticos. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* 32 (1): 43-51

Dorneles EM, Sriranganathan N, Lage AP. 2015. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Veterinary Research*. 46 (76): 1-10. doi: 10.1186/s13567-015-0199-7.

Dubey J P, Schares G. 2011. Neosporosis in animals – the last five years. *Veterinary Parasitology*. 180(1-2): 90-108.

Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*. 20(2): 323-376.

Dubey JP, Schares G. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*. 140(1-2): 1-34.

Effler, P.V., Bogard, A.K., Domen, H.Y., Katz, A.R., Higa, H.Y., Sasaki, D.M., 2002. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1464–1469

Escamilla HP, Martínez MJ, Mdedina CM, Morales SE. 2007. Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 71 (4): 314-317

Figuroa VJ, Morales SE, Martínez MJJ. 2012: Risk factors associated with infection by *Neospora caninum* in dual-purpose cattle in the central region of Veracruz, Mexico. *Veterinary Medicine International* .9(1).

Forar. A.L, Gay J.M and Hancock D.D. 1994. The frequency of endemic fetal loss in dairy cattle: review. *Theriogenology*. 43 (6):989-1000.

Freer Enrique, Castro-Arce Rocío. *Brucella*: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. *Rev. costarric. cienc. méd* [Internet]. 2001 June [cited 2017 June 20] ; 22(1-2): 73-82. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482001000100008&lng=en.

Fulton RW. 2015. Impact of species and subgenotypes of bovine viral diarrhea virus on control by vaccination. *Animal Health Research Reviews*. 16(1):40-54.

Galina C. y Valencia J. 2008. Reproducción de animales domésticos. 3ª.ed. Limusa. México. Cáp. 5:85-101.

Galina CS y Valencia MJ, editores. Reproducción de los animales domésticos. 3a ed. México (DF): Limusa, 2008.

Gamlen, T., Richards, K. H., Mankouri, J., Hudson, L., McCauley, J., Harris, M., & Macdonald, A. (2010). Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. *Journal of General Virology*, 91(1), 133–144. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016170-0>

García VZ, Cruz VC, Medina EL, García TD, Chavarría MB. 2002. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, México. *Veterinary Parasitology*. 106(2): 115-120.

García VZ, Rosario CR, Ramos AA, Cruz VC, Mapes SG. 2005. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Veterinary Parasitology* 134(1-2): 61-65.

García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Mejía-Estrada F, Rodríguez-Vivas I, Romero-Salas D, Fernández-Ruvalcaba M, Cruz-Vázquez C. 2009. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in beef cattle in three southern states of Mexico. *Tropical Animal Health and Production*. 41(5): 749-753

Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. 2005. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Veterinary Parasitology*. 128(3-4):231-241.

Hong P, R Tsolis, T Ficht. 2000. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infection and Immunity*. 68, 4102-4107.

Javier, F., & Peña, G. (2016). Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina, (November).

Jones C, Chowdhury S. 2007. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews* 8: 187-205.

Kmety E, Dikken H. 1993. Classification of the Species *Leptospira interrogans* and History of its Serovars. University Press Gronigen; The Netherlands.

Kovács, F., Magyar, T., Rinehart, C., Elbers, K., Schlesinger, K., & Charles, W. (2003). The live attenuated bovine viral diarrhoea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal infection, 96, 117–131. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00209-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00209-8)

Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P., & Brownlie, J. (2014). Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *The Veterinary Journal*, 199(2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>

Lee JE, Kim LH. 2007. Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performance and the economic impact. *Journal of Veterinary Science*. 8(3):283-288.

Liebler T, E. M., Greiser. W, I., Pohlenz, J. F. (1997). Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Archives of Virology*, 142(8), 1613–1634. <https://doi.org/10.1007/s007050050184>

Locatelli DR., Regidor CJ., Ortega ML. M., Oliveira Koch, M. de, Busch, A. P. B., Gonçalves, K. A., Cruz, A. A. (2018). Isolation of *Neospora caninum* from kidney and brain of a bovine foetus and molecular characterization in Brazil. *Experimental Parasitology*, 185, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.01.004>

Luna AMA, Moles CLP, Gavaldón RD, Vásquez NC, Salazar GF. 2005. Estudio retrospectivo de seroprevalencia de leptospirosis bovina en México considerando las regiones ecológicas. *Revista Cubana Medicina Tropical*. 57: 28-31

Mahajan, V., Banga, H. S., Deka, D., Filia, G., & Gupta, A. (2013). Comparison of diagnostic tests for diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis in natural cases of bovine abortion. *Journal of Comparative Pathology*, 149(4), 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.05.002>

Mahajan, V., Banga, H. S., Deka, D., Filia, G., & Gupta, A. (2013). Comparison of diagnostic tests for diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis in natural cases of bovine abortion. *Journal of Comparative Pathology*, 149(4), 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.05.002>

Martell M, Soto L, Castellanos L, McCauley EH, Johnson DW. 1974. IBR virus isolated from two epizootics in Mexican dairy cattle. "Veterinary medicine, small animal clinician. 69(8):1045-1047.

Méndez-Lozano, Rodríguez-Reyes EJ, Sánchez-Zambrano LM. 2015. Brucellosis, a zoonotic disease present in the population: A time series study in Mexico. *Salud Pública México*. 57 (6): 519-527.

Mickelsen D, Evermann JF. 1994. In utero infections responsible for abortion, stillbirth and birth of weak calves in beef cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 10(1): 1-14.

Miller, R.B. (1982) A Discussion on Reproductive failure in Cattle. *Bov. Pract.*17: 39-51.

Mittal, M., Sharma, V., Nehra, K., Chakravarti, S., Kundu, K., Bansal, V. K., ... Kumar, A. (2018). Abortions in an organized dairy farm from North India reveal the possibility of breed susceptibility to Bovine Brucellosis. *One Health*, 5, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.11.001>

MoennigV, Liess B, 1995. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 11: 477-487.

Moles CLP, Dolores G, Torres BJ, Cisneros PMA, Aguirre SJ, Rojas SN. Seroprevalencia simultánea de leptospirosis y tres enfermedades de importancia reproductiva en bovinos del Altiplano central de la república mexicana. *Rev. Salud Anim.*2002; 24:2:106-110.

Moeller Jr BR, Adaska J, Reynolds J, Blanchard CP. 2013. Systemic *Bovine herpesvirus 1* infections in neonatal dairy calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(1) 136–141.

Morales SE, Trigo FJ, Ibarra F, Puente E, Santacruz M. 2001. Neosporosis in Mexican Dairy Herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *Journal of Comparative Pathology* 125(1): 58-63.

Morales SE, Trigo TFJ, Ibarra VF, Puente CE, Santacruz M. 2001. Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 13(5): 413-415.

Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS. 2009. S. Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews*. 10(1): 85-98.

Nandi, S., Kumar, M., Manohar, M., & Chauhan, R. S. (2009). Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 10(1), 85–98. <https://doi.org/10.1017/S1466252309990028>

Nandi, S., Kumar, M., Manohar, M., & Chauhan, R. S. (2009). Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 10(1), 85–98. <https://doi.org/10.1017/S1466252309990028>

OIE. 1992. Office Internacional des Epizooties. Manual of Standards for Diagnostic Test of Leptospirosis. OIE, Paris.

OIE. 2008. Office Internacional des Epizooties. Manual of Standards for Diagnostic Test of Leptospirosis.

Orozco MA, Morales E, Salmerón F. 2013. Characterization of the inflammatory response in the uteri of cows infected naturally by *Neospora caninum*. *Journal of Comparative Pathology*.148 (2-3): 148-156.

Osburn BI, Maclachlan NJ, Terrell TG. (1982) Ontogeny of the immune system. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 181(10): 1049-1052.

Otaka, D., Penna, B., Martins, G., Hamond, C., Lilenbaum, W., & Medeiros, M. A. (2013). Rapid diagnostic of leptospirosis in an aborted bovine fetus by PCR in Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Microbiology*, 162(2–4), 1001–1002. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.037>

Panorama de la lechería en México. 2015. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/wpcontent/uploads/boletinleche/Brochure_leche_DIC2015.pdf

Pfeiffer DU, Williamson NB, Reichel MP, Wichtel JJ, Teague WR. 2002. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. *Preventive Veterinary Medicine*. 54(1):11-24.

Plank R, Dean D. 2000. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and Infection*. 2(10):1265-1276.

Pradutkanchana, S., Pradutkanchana, J., Khuntikij, P., 2003. Detection of IgM specific antibody using indirect immunofluorescent assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J. Med. Assoc. Thai*. 86, 641–646

Reichel MP, Mcallister, MM, Pomroy WE, Campero C, Ortega-Mora LM, Ellis JT. 2014. Control options for *Neospora caninum* – is there anything new or are we going backwards? *Parasitology*. 141(11):1455-1470.

Rogel HMM, 2011, Evaluación y caracterización del aborto como impacto económico en la producción de seis hatos de ganado lechero en el complejo agropecuario industrial de Tizayuca, Hidalgo. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional autónoma de México.

Salinas MJA, Mora GJJ, Zárata RJJ, Rojas VVM, Hernández VG, Dávalos AG, Ramírez RR, Galán ALC, Ávalos RR. 2005. Frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en ganado bovino del noreste de México. *Veterinaria México* 36(3): 303-311.

Sánchez C.Y.M, Pedroso M. , Rodríguez D.J.G. Encuesta serológica de agentes infecciosos, relacionados con abortos en vacas lecheras. 2008. *Revista Salud Animal*. 30 (1):65-67.

Sánchez CYM, Pedroso RM, Diego RJ. *Neospora caninum* asociado con algunos agentes patógenos vinculados al aborto en vacas lecheras del estado de Hidalgo, México. UAM;2012

Sánchez, B., Hernández, S., Israel, F., Aparicio, D., González, P., & Andrade, H. (2000). EN VACAS REVACUNADAS CON DOSIS REDUCIDA DE CEPA 19 DE *Brucella abortus*. *Técnica Pecuaria En México*, 38(1), 35–42.

Sánchez, G.F., Banda, R.V., Sahagun, R.A., Ledesma, M.N., Morales, S.E. (2009). Comparison between immunohistochemistry and two PCR methods for detection of *Neospora caninum* in formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue of bovine fetuses. *Vet. Parasitol*. 164: 328-332.

Sánchez-Castilleja Y M., Pedroso M y J.G. Rodríguez D, 2008, Encuesta serológica de agentes infecciosos, relacionados con abortos en vacas lecheras, *Revista de salud animal*, 30:65-67.

Santana OI, Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L, Ramos-Parra M, Castellanos-Morales C, Quezada-Gallardo D. 2010. Neospora caninum: Detección de ADN en sangre durante la primera gestación de vaquillas infectadas naturalmente. *Veterinaria México*. 41(2): 131-137.

Santos, A.P.M.E. Navarrl.T. o, Bracarense A.P.F.R.L., Freire R.L., Marana E.R.M., Ogawa L., Alfieri A.A. Freitas², J.C., Vidotto O. 2005. Dairy cow abortion associated with Neospora caninum and other infectious agents. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57 (4) ;545-547

Santurde, G. (1996). Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus — 1 genome in clinical samples. *Veterinary Microbiology*, 49(1–2), 81–92. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00169-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00169-7)

Schalafer HD, and Foster AR. Chapter 4: female genital system. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Volume 3, 6th Edition. 2016; 399-439.

Segura-Correa JC, Domínguez-Díaz D, Avalos-Ramírez R, Argaez-Sosa J. 2010. Intra-herd correlation coefficients and design effects for bovine viral diarrhoea, infectious bovine rhinotracheitis, leptospirosis and neosporosis in cow-calf system herds in North-eastern Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*. 96(3-4):272-275.

Segura-Correa JC, Solorio-Rivera JL, Sánchez-Gil LG. 2010. Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herds of Michoacan, Mexico. *Tropical animal health and production*. 42(2):233-238.

Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd ed. Ephrata, PA. Current Conceptions, Inc., 2003.

Servicio Nacional de Sanidad, I. y. (20 de 06 de 2016). *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria* . Obtenido de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-041-zoo-1995-campana-nacional-contra-la-brucelosis-en-los-animales>

Sondgen, P. et al. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetalserology (2001). *Veterinary Parasitology*, 102;4; 279-29

Takiuchi E, Medici KC, Alfieri AF, Alfieri AA. Bovine *herpesvirus* type 1 abortions detected by semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. *Res. Vet. Sci.* 2005; 79:85-88

Teane MAS, Ranquel GO, Juliana OSM, Mariana NX, Tatiane AP, Adriana Cortez, Marcos BH, Leonardo JR, Andrey PL, Rentao LS. 2010. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion PCR. *Ciencia rural santa maria*. 39 (9); 2563-2570

Tramuta, C., Lacerenza, D., Zoppi, S., Gorla, M., Dondo, A., Ferroglio, E., Rosati, S. (2011). Journal of Veterinary Diagnostic. <https://doi.org/10.1177/1040638711407880>

Wareth, G., Melzer, F., Böttcher, D., & El-diasty, M. (2016). Acta Tropica Molecular typing of isolates obtained from aborted fetuses in Brucella -free Holstein dairy cattle herd after immunisation with Brucella abortus RB51 vaccine in Egypt. *Acta Tropica*, 164, 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.019>

Wareth, G., Melzer, F., Tomaso, H., Roesler, U., & Neubauer, H. (2015). Detection of Brucella abortus DNA in aborted goats and sheep in Egypt by real-time PCR Veterinary Research. *BMC Research Notes*, 8(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1173-1>

Wynwood SJ, Burns MA, Graham GC, Weier SL, McKay DB, Craig SB. 2016. Serological diagnosis of Leptospirosis in bovine serum samples using a microsphere immunoassay. *Veterinary Record Open*; 3:e000148. doi:10.1136/vetreco-2015-000148.

Zenteno R G. 2008. Perfil serológico para los principales agentes infeccioso asociados con problemas reproductivos en bovinos de leche en diferentes estados de la república mexicana. Tesis de licenciatura.