



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA**  
**PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE POOLS COMO HERRAMIENTA PARA EL MONITOREO**  
**SEROEPIDEMIOLÓGICO A NIVEL DE HATO DE DVB, IBR, LEUCOSIS Y**  
**NEOSPOROSIS EN REGIONES GANADERAS DEL TRÓPICO MEXICANO**

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

**PRESENTA:**  
**LUIS FERNANDO ESPINOSA CASTILLO**

**TUTORES PRINCIPALES**  
**PhD Juan Heberth Hernández Medrano Nottingham Universidad**  
**Dra. Ana Delia Rodríguez Cortez FMVZ-UNAM**  
**PhD Wendela Wapenaar Nottingham University**

**Ciudad Universitaria, Cd Mx|**

**Diciembre 2019**



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 madre la Dra. Patricia Castillo Salazar quien nunca me ha dejado rendirme y siempre ha creído en mi sin importar nada.

A mi abuela “Chonita” quien siempre ha visto por mí en los momentos felices y tristes de mi vida.

A mi hermano Javier Alejandro Yañez Castillo, quien, a pesar de no compartir las mismas ideas, siempre puedo contar con su apoyo y cariño en los momentos difíciles.

A los doctores que me han ayudado a crecer y madurar en los departamentos de Rumiantes y Reproducción.

A todos los amigos que he conocido en mi vida y que a pesar de el tiempo y la distancia siguen riendo conmigo y disfrutando de los ratos que pasamos juntos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al programa de Maestría y Doctorado en Producción y Salud Animal de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Banco de sueros del Departamento de Reproducción Animal, por permitirme realizar el experimental en sus instalaciones y facilitarme los medios para la realización de la tesis.

Al Dr. Juan Heberth Hernández Medrano por aceptarme como su alumno de posgrado, apoyarme en los experimentos y permitirme conocer otro país y ganar mas experiencia para mi formación académica.

A la Dra. Ana Delia Rodríguez Cortes, quien acepto ser mi segundo tutor, me instruyo en la redacción de la tesis y me permitió un trabajo en momentos de necesidad.

A la Dra. Wendela Wapenaar por aceptar ser mi tutor externo y me ayudó en la redacción del artículo científico.

A las Doctoras Lucia Eleana Rangel Porta y Aranza Lassala quienes siempre estuvieron apoyándome e incentivándome a seguir adelante.

Al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar, por ayudarme en los momentos difíciles y brindarme un espacio en el banco de sueros.

A mis compañeros ayudantes de profesor y alumnos de maestría (Andrea López, Antonio Solano, Axel Hayashi, Cecilia Montoya, Daniela Reyes, Diana Velázquez, Enrique Soberanes, Europa Meza, Ivan Pérez, Jocelyn Palacios, Katia Montoya, Pablo Escorcia) con quienes conviví, aprendí y disfruté mi estancia en el departamento de Reproducción.

<b>INDICE</b>	
<b>DEDICATORIA</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>DIARREA VIRAL BOVINA</b>	<b>4</b>
<b>RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA</b>	<b>5</b>
<b>LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA</b>	<b>6</b>
<b>NEOSPORA CANINUM</b>	<b>8</b>
<b>PRUEBAS DIAGNOSTICAS</b>	<b>9</b>
<b>USO DE POOLS</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>13</b>
<b>COLECCIÓN DE MUESTRAS</b>	<b>13</b>
<b>TOLERANCIA A LA DILUCION</b>	<b>14</b>
<b>ELISAS</b>	<b>14</b>
<b>SERO-EPIDEMIOLOGIA</b>	<b>16</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>17</b>
<b>TOLERANCIA A LA DILUCIÓN</b>	<b>17</b>
<b>ESTUDIOS SERO-EPIDEMIOLOGICOS</b>	<b>22</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
<b>TOLERANCIA A LA DILUCIÓN</b>	<b>30</b>
<b>ESTUDIOS SERO-EPIDEMIOLOGICOS</b>	<b>33</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>38</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>39</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>51</b>

# **EVALUACION DE POOLS COMO HERRAMIENTA PARA EL MONITOREO SEROEPIDEMIOLOGICO A NIVEL DE HATO DE DVB, IBR, LEUCOSIS Y NEOSPOROSIS EN REGIONES GANADERAS DEL TROPICO MEXICANO**

## **RESUMEN**

La capacidad reproductiva de un animal impacta la eficiencia económica del hato ya que determina el potencial de producción de carne, leche y becerros. Esta capacidad se ve afectada por varios factores como son una alimentación inadecuada, mala detección de celos, errores en el proceso de inseminación y por enfermedades reproductivas. Estas últimas constituyen la segunda causa en importancia para la disminución en la eficiencia reproductiva del hato y algunos de los agentes causales son los virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB), Rinotraquetitis Infecciosa Bovina (IBR), Parainfluenza 3 (PI3), algunas especies de bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* (Tb), *Brucella abortus*, *Leptospira spp*, *Clamidia abortus* y parásitos como *Neospora caninum* (NC).

Para conocer si un hato es libre de estas enfermedades, es recomendado realizar monitoreos periódicos (semestrales o anuales) mediante pruebas diagnósticas que identifiquen a las enfermedades reportadas en la región que se encuentre el hato. Sin embargo, el realizar este monitoreo es costoso; por un lado, debido a las características de las pruebas utilizadas y por otro a las exigencias en tiempo y manejo necesarias para llevar a cabo los muestreos, sobre todo cuando se realizan en un gran número de individuos. Una alternativa es la de muestrear un cierto número de animales al azar, en grupos o lotes de interés, mezclando las muestras (pools) para que sea más económico y rápido para el monitoreo de las enfermedades.

El objetivo de este estudio fue evaluar la utilización de pools como un método de monitoreo sero-epidemiológico para conocer la exposición de animales susceptibles (no vacunados) a algunas enfermedades reproductivas (DVB, IBR y NC) y degenerativas (Leucosis Enzoótica Bovina [LEB]) en hatos de 5 estados en regiones tropicales de México: Chiapas, Guerrero, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz.

Los resultados muestran que el uso de pools para el monitoreo sero-epidemiológico de DVB, IBR y LEB es eficiente como herramienta diagnóstica, no siendo así para NC. Se encontró además que los hatos positivos a DVB, IBR y LEB pueden identificarse incluso al utilizar los pools en una dilución 1/10. La prevalencia de IBR y DVB fue alta en los cinco estados muestreados (del 87 al 90%), mientras que la de LEB y NC fue menor (del 23 al 67%).

Palabras Claves: Pool, DVB, IBR, Leucosis, Neosporosis, Seroprevalencia

## ABSTRACT

The reproductive ability of an animal impacts the economics of the herd as it determines the production potential of meat, milk and calfs. This ability is affected by several factors such as inadequate feeding, poor estrous detection, errors in the insemination process and reproductive diseases. The last ones are the second important cause for the decrease in reproductive efficiency of the herd and some of the causal agents are viruses like Bovine Viral Diarrhea (BVDV), Infectious Bovine Rinotrachetitis (IBR), Parainfluenza 3 (PI3), some species of bacteria such as *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Leptospira spp*, *Clamylidia abortus* and parasites such as *Neospora caninum* (NC).

To find out if a herd is free of these diseases, it is recommended to carry out periodic (semi-annual or annual) monitoring using diagnostic tests, that identify the diseases reported in the region that the herd is found. However, performing this monitoring is costly, due to the characteristics of the tests used and difficult for the time and management requirements necessary to carry out the sampling, especially when performed on many individuals. An alternative is to sample a certain number of animals at random, in groups or lots of interest, mixing the samples (pools) to make it cheaper and faster for disease monitoring.

The objective of this study was to evaluate the use of pools as a sero-epidemiological monitoring method for exposure of susceptible (unvaccinated) animals to some reproductive diseases (DVB, IBR and NC) and degenerative diseases (Enzootic Leukosis Bovina [LEB]) in herds of 5 states in tropical regions of Mexico: Chiapas, Guerrero, Tabasco, Tamaulipas and Veracruz.

The results show that the use of pools for sero-epidemiological monitoring of DVB, IBR and LEB is efficient as a diagnostic tool, not being so for NC. It was further found that positive herds to DVB, IBR and LEB can be identified even when using pools in a 1/10 dilution. The prevalence of IBR and DVB was high in the five sampled states (87 to 90%), while LEB and NC were lower (23 to 67%).

**KEYWORDS:** Pool, DVB, IBR, Leucosis, Neosporosis, Seroprevalence

## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con información proporcionada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, el ganado representa 40 % del valor mundial de la producción agrícola y es la base de los medios de subsistencia y la seguridad alimentaria de casi mil millones de personas. En los países en vías de desarrollo, la reproducción del ganado es una actividad multifuncional; el progreso y la transformación de este sector ofrecen oportunidades de desarrollo agrícola, reducción de la pobreza y mejora de la seguridad alimentaria, pero, la falta de vigilancia en la salud animal impide este progreso (1).

El ganado es esencial para los sistemas de producción agropecuaria, en sistemas de doble propósito llegan a consumir alimentos que no se lograron vender, produce estiércol para abonar el suelo de siembra, acondiciona los campos para la labranza y ayuda en formas de transportación de alimentos y personas. En el ámbito mundial el ganado aporta el 15% de la energía alimentaria total y el 25% de las proteínas de la dieta diaria. Los productos provenientes del ganado proporcionan nutrientes esenciales que no se obtienen fácilmente a partir de alimentos vegetales (2).

La ganadería en México se desarrolla en el 50% del territorio nacional y en todas las regiones climáticas con las que cuenta nuestro país. Los últimos censos indican que existen alrededor de 32 millones de cabezas de ganado bovino. En el 2003, México ocupó el séptimo lugar en producción de carne y el décimo en producción de leche a nivel mundial al alcanzar 1,500 millones de toneladas de carne y 10,000 millones de litros de leche. (3).

Alrededor del 56% del total de la población bovina en México se encuentra en la región del trópico (tanto seco como húmedo), misma que comprende cerca del 25% del territorio nacional. Las elevadas temperaturas ambientales que se alcanzan en esta región impulsan a los ganaderos a utilizar diferentes sistemas de producción que se adapten a su entorno y que incluyen; sistemas de tipo familiar, extensivos y semi-intensivos con producción de carne, leche o de doble propósito;



además ellos prefieren cruzar dos diferentes razas de bovinos para mejorar la producción y la salud de sus animales. La alimentación usada en estos sistemas es basada en pastoreo con pastos nativos (*Paspalum spp* y *Axonopus spp*), pastos introducidos (*Panicum maximum*, *Cynodon plectostachyus*, *Echinochloa polistachya*, entre otros) y en el menor de los casos, suplementación con concentrado (2,4).

La primera causa que afecta la salud en un hato bovino son las deficiencias nutricionales ya que generan pérdidas en la ganancia diaria de peso (GDP) y en los kilogramos de leche producida; la segunda causa que impacta la salud son las enfermedades reproductivas, afectando la rentabilidad de este al carecer de animales de reemplazo y viendo reducidas las GDP o la producción de leche. Estas enfermedades afectan a todo tipo de producción (carne, leche y doble propósito), evaluaciones realizadas en USA reportan pérdidas económicas de alrededor de 555 USD y hasta de 2,333 USD (por animal), principalmente por el aumento del intervalo entre partos, desecho de animales y baja en la fertilidad (5).

Los agentes infecciosos implicados más comunes son los virus que causan la Diarrea Viral Bovina (DVB) y la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR por sus siglas en inglés), así como las bacterias y parásitos que originan la Brucelosis, la Leptospirosis y la Neosporosis. Debido a las características propias de los agentes causales y a la fisiopatología de estas enfermedades, el diagnóstico definitivo se logra sólo en el 25% de las ocasiones (6,7).

Sin embargo, debido a la gran cantidad de animales que existen en el país la evaluación individual es imposible debido a los costos de realización, de los ensayos de laboratorio y el material utilizado para el muestreo de una gran cantidad de animales. Para poder obtener una idea de la prevalencia de cualquier enfermedad, se han vuelto cada vez más común el uso de estudios epidemiológicos usando pools (muestras mezcladas), ya que puede implementarse en estudios longitudinales, donde el costo de realizar múltiples ensayos a lo largo del tiempo puede ser prohibitivo (8,9).

Esta técnica aumenta la eficiencia del procesamiento de un gran número de muestras siempre que la sensibilidad no se reduzca en gran medida; los pools mejoran el tiempo y la eficiencia de costos del procesamiento de muestras con un solo análisis. Los pools se forman al agrupar alícuotas de igual volumen de las muestras individuales y posterior a eso se realiza una medición para cada una de estas nuevas muestras. El resultado del ensayo para cada muestra estima la media aritmética de las concentraciones de los individuos del conjunto (10,11).

El muestreo en forma de pools es un método utilizado en la medicina humana y veterinaria para obtener información de cualquier enfermedad en donde los resultados individuales no sean necesarios (por ejemplo, el detectar la presencia de alguna enfermedad en hatos libres) o cuando el método de diagnóstico es particularmente excesivo para realizarlo (más de 1,000 muestras individuales para un solo trabajador)

Algunos ejemplos de la utilización de pools en métodos diagnósticos son: el empleo de pools de piel de oreja para el diagnóstico de DVB mediante PCR (9,12), los pools de heces para detectar la presencia de diferentes cepas de *Salmonella spp.* en terneros (13) y las muestras de leche de tanque para el diagnóstico de *Staphylococcus aureus* en hatos con mastitis (14) (15). En medicina humana se utilizan los pools de suero para la detección de VIH en la sangre utilizada para transfusión (16).

Los pools son comúnmente utilizados para la vigilancia de enfermedades infecciosas, monitoreo de animales previamente expuestos a patógenos específicos y para ayudar en las decisiones de manejo poblacional.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Diarrea Viral Bovina

Causada por un pestivirus, el diámetro de este virus oscila entre los 40 a 60 nanómetros. Posee 4 proteínas estructurales, una proteína de núcleo C y dos glicoproteínas de envoltorio (E1 y E2); las cuales están localizadas en el virión. Por ser un virus RNA puede generar mutaciones en la glicoproteína E2, impidiendo así que sea reconocido por el sistema inmune del huésped. Los virus pueden ser detectados mediante antígenos localizados en bazo, corazón, riñones y linfonodos del mesenterio, del tracto digestivo y del respiratorio (17,18).

La presentación de infecciones agudas ocurre principalmente cuando se introducen animales infectados a un hato previamente libre de la enfermedad, causando una diseminación rápida. El virus se dispersa mediante secreciones corporales (exudados nasales, secreciones genitales, semen) y en forma de aerosoles (19). También existe transmisión por huéspedes intermediarios (principalmente fauna silvestre), que son más difíciles de controlar, por lo que se debe evitar que entren en contacto con los animales que se tienen en el hato (20). El mayor impacto económico de esta enfermedad es causado por las infecciones intrauterinas que generan disfunciones reproductivas tardando hasta 4 meses en resolverse; el virus puede atravesar la placenta e infectar al feto en los primeros 3 meses de gestación generando así animales persistentemente infectados (P.I.), que son animales que no montan una respuesta inmunológica en contra del virus, y diseminan el virus durante toda la vida del animal; estos animales no son detectados por las pruebas diagnósticas normales. Incluso daña el tracto genital de los machos causando un bajo conteo espermático. En Norte América la vacunación es la primera medida para controlar esta enfermedad, cuyo objetivo principal es el de prevenir las enfermedades agudas, así como la presentación de enfermedades reproductivas y evitar la creación de animales P.I. quienes son la principal causa de la diseminación de la enfermedad (21)

Estudios realizados en diversos países de la Unión Europea, han encontrado que las prevalencias de DVB en los hatos van del 14.6% al 95%. En Inglaterra y Gales se reportan prevalencias más elevadas, con altos títulos de anticuerpos séricos (95% y 66% respectivamente) (22). Por su parte, en estudios realizados en países de climas tropicales se observa que los hatos tienen una prevalencia que va del 22% al 70%; como ejemplo Brasil realizó un muestreo de tanques de leche y de muestras individuales de suero, encontrando una prevalencia de alrededor del 48.8% en ambos casos (23,24).

En México, el primer informe de DVB se realizó en 1975 en un estudio para detectar anticuerpos en vacas con antecedentes clínicos de infertilidad y abortos, mostrando una seropositividad del 75%. Otros estudios revelan la presencia de anticuerpos contra la DVB, mostrando una sero-prevalencia del 14–29%. También se ha podido demostrar la presencia de anticuerpos contra DVB en los hatos de carne y leche en México; ellos concluyen que la DVB se encuentra diseminada ampliamente en el país, incluso hay reportes de una seropositividad del 28,8% para el estado de Yucatán. Incluso hay reportes que mencionan la diversidad genética presente en México, en donde mencionan que, en diferentes estados de la república, hay varios genotipos del virus (Hidalgo, Morelos, Querétaro, Veracruz, Tamaulipas y Chihuahua) mostrando también la seroprevalencia de esos estados (25–27).

#### Rinotraqueitis Infecciosa Bovina

Causada por un herpesvirus de la familia alphaherpesviridae. Se clasifica en tres subtipos: BoHV-1,1, BoHV-1,2 a y BoHV-1,2 b. La mayoría de las cepas BoHV-1,1 han sido aisladas de vías respiratorias o casos de aborto y las cepas BoHV-1,2 de lesiones de órganos genitales. El genoma está compuesto de una molécula larga de DNA de un tamaño de 135.3k pares de bases que se forma de una secuencia larga (UL) y otra corta (US). Durante la replicación del ADN, tanto la UL como las regiones de US pueden intercambiarse, generando cuatro isómeros del genoma viral dentro del ADN (28).

Esta enfermedad se caracteriza por causar gran variedad de signos clínicos entre los cuales se encuentran rinitis, vulvovaginitis, balanopostitis, conjuntivitis e infección generalizada. También hay reportes de esplenomegalia, hemorragias, hiperemia y necrosis cerebral, además de edema y congestión placentaria, causando en animales gestantes abortos a partir del cuarto y hasta el octavo mes de gestación (29,30).

Las pérdidas económicas que se generan por la presentación de esta enfermedad se relacionan a la disminución de la producción de carne, leche y la pérdida de becerros debida a los abortos. Varios países de la unión europea empezaron a implementar sistemas de control en los años ochenta y en la actualidad casi todos implementan programas epidemiológicos usando la erradicación obligatoria de animales infectados y el uso de vacunas marcadoras (treinta días antes de entrar al empadre, con el fin de generar memoria inmunológica). El problema que se tiene para controlar esta enfermedad es que la eliminación de los portadores es problemática debido a la falta de signos clínicos específicos para detectarlos (31,32).

Para evitar esto, se utilizan vacunas tipo DIVA, con base a la glicoproteína E del virus. Estas han demostrado ser una estrategia de prevención segura y eficaz contra el ingreso de IBR a los hatos. Para identificar si un hato está infectado, la Unión Europea valida el uso de kits ELISAs de tipo indirecto para detectar anticuerpos en muestras de taque de leche de hasta 50 individuos, siendo así una estrategia rápida y económica (33).

En México la seroprevalencia de BoHV-1 se ha reportado en unidades de producción lechera y de carne de ganado bovino a través de todo el país, en el estado de Veracruz se han reportado seroprevalencias del 59 al 80% en búfalos de agua en pastoreo, del 34 al 41% en Puebla y 83 al 91 en Tabasco (34–36).

#### Leucosis Enzoótica Bovina

La leucosis enzoótica bovina (LEB) es causada por un retrovirus formado por las proteínas estructurales internas PL5, p24, PL2, PL4, y las glicoproteínas de

envoltura gp30 y gp51. Afecta al tejido linfoide causando linfomas malignos y linfosarcomas (37). La mayoría de las infecciones son asintomáticas, generando una infección crónica con linfocitosis persistentes (L.P.) en un 20-30% de los casos, mientras que los linfomas malignos (que es la forma fatal de la enfermedad), se desarrollan en el 1-5% de los bovinos seropositivos. Cuando se presentan los linfomas, los signos que se observan son el engrosamiento de linfonodos, pérdida de peso, disminución en la producción de leche, fiebre e inapetencia (37).

Si bien esta enfermedad no afecta principalmente al aparato reproductivo, debido a que el animal monta una respuesta en contra el virus, la energía destinada al mantenimiento y reproducción es disminuida, con lo que se llegan a observar abortos a partir del sexto mes de gestación. Los animales permanecen infectados de por vida y comienzan a mostrar una respuesta inmunológica a las 3 semanas post-infección (38).

Al permanece infectado de por vida, las posibilidades de quedar gestante se ven disminuidas en los estros siguientes (39). Su forma de transmisión es por el contacto directo de la sangre de un animal infectado con la de otro. La forma más común es por iatrogenias mediante el equipo de descorne que no ha sido desinfectado. No existe tratamiento ni vacuna contra la enfermedad por lo que lo más importante es evitar que ingrese a los hatos (40).

Para erradicar la enfermedad se deben detectar de manera rápida los casos clínicos y llevar un monitoreo de estos (41). La prevalencia de esta enfermedad en ganado lechero en Canadá incrementó del 49.2% en 1989 al 90% en el 2013. Los Países de la Unión Europea realizan monitoreos anuales de esta enfermedad, según los cuales Bélgica reporta una prevalencia del 67%, Escocia del 48% para el ganado lechero y un 82% para el de carne, e Irlanda del 77.4%. Por su parte, Estados Unidos reveló que el 83.9% de los hatos son positivas a la enfermedad. Finalmente, en Latinoamérica se reportan prevalencias del 99% en Uruguay, 82.1% en Ecuador, 94% en Costa Rica y 51% en Perú (42)

En México, la LEB se detectó en 1983 y desde entonces, varios estudios serológicos han investigado la persistencia de esta infección en el ganado en todo el país, reportando tasas de seroprevalencia del 11 al 66%. Estos estudios sugieren que la diseminación de esta enfermedad es muy alta en México. Sin embargo, las herramientas diagnósticas disponibles en el país limitan a las pruebas para conocer la prevalencia real en México (43).

### *Neospora caninum*

*Neospora caninum* (NC) es un protozooario que afecta al ganado y a los animales de compañía (de manera más común a los perros). Tiene un ciclo de vida de tres fases: esporozoítos, taquizoitos y bradizoitos. Los taquizoitos son la fase infectante, de forma ovoide (semilunar o globular) miden de 1 a 7mm, dependiendo de la etapa de división que se encuentren (44). Estos infectan diversas células como macrófagos, fibroblastos, células endoteliales vasculares, miocitos, células epiteliales tubulares renales y hepatocitos. Penetran a las células por invasión activa y se internalizan en los primeros 5 minutos localizándose en el citoplasma dentro de una vacuola. Estas células infectadas llegan a contener hasta 100 taquizoitos (45).

Esta enfermedad es una de las principales causas de aborto en bovinos, reportándose con mayor frecuencia a los 6 meses de gestación. Los fetos pueden morir en el útero, ser reabsorbidos, momificados o autolizados. También pueden encontrarse mortinatos, becerros nacidos vivos con signos clínicos o clínicamente sanos pero P.I. (46).

Suiza reporta una prevalencia en el ganado lechero que va del 6% al 65%; mientras que en Brasil es del 30.9%; en Israel del 35.5%, en Irán del 9.8%, en Venezuela del 11.3% y en Colombia del 76.9%. Los principales factores de riesgo para la entrada de la enfermedad en los hatos son la presencia de perros infectados que conviven directamente con el ganado y su diseminación es debido a la presencia de heces de los perros en los comederos de los bovinos (47–49).

Existe poca información sobre la sero-prevalencia de NC en México, más allá de demostrar que se ha reportado infección por *N. caninum* en vacas y fetos abortados. La prevalencia a nivel de rebaño reportada oscila entre el 10 y el 100% y está distribuida ampliamente en las regiones lecheras del país, con reportes de una sero-prevalencia del 56%. Un estudio realizado en Aguascalientes, que es uno de los principales estados productores de leche, reporta una cero-prevalencia entre el 57 y el 59% y la presencia del parásito se ha demostrado en fetos abortados a través de inmunohistoquímica y PCR (50,51).

### Pruebas diagnósticas

Para el diagnóstico de DVB, IBR, LEB y NC, pueden medirse la presencia de antígenos o anticuerpos en suero u otros fluidos biológicos o tejidos. En el caso de la DVB, se puede optar por el aislamiento del virus (AV), o por la detección de antígenos mediante pruebas como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), la inmunohistoquímica (IHQ) y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

El diagnóstico de IBR se realiza mediante la evaluación de lesiones histológicas compatibles (LHC), aislamiento viral, inmunohistoquímica, la reacción en cadena viral del antígeno y de polimerasa (PCR) y el ELISA indirecto (este último es utilizado con mayor frecuencia debido a que da los resultados en poco tiempo [2 a 3 horas]) (30). Para la LEB se realizan las pruebas de inmunodifusión del gel de agar (IDGA) y el ELISA (que ha sustituido a la IDGA en los programas de erradicación y existen varios kits disponibles comercialmente) (37,38,41).

Para NC el método de diagnóstico utilizado es la evaluación histopatológica, donde se buscan cambios degenerativos e inflamación. En el producto abortado las lesiones que se buscan se encuentran en el sistema nervioso central, corazón e hígado, y en la vaca las lesiones que se buscan son gliosis en el sistema nervioso central, miocarditis e infiltrados mononucleares en hígado y riñones. Así mismo, mediante la tinción hematoxilina-eosina (H&E), se pueden observar los taquizoitos en los órganos antes mencionados. Las pruebas serológicas que se



utilizan son los ELISAs, la prueba de inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos (IFI) y el inmunoblot. Estos métodos sirven para detectar si un hato es positivo a la enfermedad y para identificar a los animales enfermos para así evitar que sigan diseminando la enfermedad (44).

El ensayo ELISA se utiliza como herramienta de diagnóstico en medicina y como medida de control de calidad en diversas industrias; también se utiliza como herramienta analítica en la investigación biomédica para la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos específicos en una muestra determinada. Este procedimiento comparte principios similares del radioinmunoensayo (RIA). ELISA utiliza el concepto básico de inmunología donde un antígeno se une a su anticuerpo específico, lo que permite la detección de cantidades muy bajas de antígenos como proteínas, péptidos, hormonas o anticuerpos en una muestra líquida. Se utilizan antígenos y anticuerpos marcados con enzimas para detectar las moléculas, siendo las enzimas más utilizadas la fosfatasa alcalina y la glucosa oxidasa (52).

#### Uso de pools

El detectar estas enfermedades de manera rápida y oportuna en los hatos debe ser una tarea prioritaria para evitar que se diseminen y causen abortos. Sin embargo, la evaluación periódica de cada uno de los individuos resulta costosa, por lo que el uso de técnicas que permitan determinar la presencia de enfermedades de forma colectiva en el hato resulta ventajoso. Una alternativa para ello es el uso de pools, en donde se pueden juntar hasta 100 animales, para obtener una sola muestra, en la que se llevan a cabo los análisis de diagnóstico necesarios para determinar la presencia de una o más enfermedades (9).

A pesar de la efectividad de la PCR para la detección de patógenos en pools, este método requiere equipo especializado y entrenamiento para realizarlo; es por esto que los laboratorios han buscado formas de diagnóstico más prácticas y simples de realizar. Los ELISAs cumplen con estos requerimientos, son inmunoensayos frecuentemente utilizados y disponibles en el mercado. No precisan de equipos

sofisticados, son fáciles de realizar, rentables, han sido validados para una amplia gama de enfermedades y especies además de permitir el uso de diferentes tipos de muestras como son leche, plasma y suero (53,54).

Una desventaja al utilizar pools en el ELISA es una posible disminución en la sensibilidad de detección, debido a la dilución de anticuerpos o antígenos cuando hay pocos animales infectados o los títulos son bajos, lo que puede generar falsos negativos. Sin embargo, los falsos positivos, que se asocian a la especificidad de un ELISA, son menos probables que cuando se utilizan muestras individuales (52).

Es posible la identificación de hatos positivos utilizando pools mediante pruebas de ELISA para las cuatro enfermedades antes mencionadas, así se observa en trabajos previos que reportan prevalencias de 88% y 80% para DVB e IBR respectivamente, utilizando pools de hasta 25 animales. De igual forma, se sabe que este tipo de ensayos permiten incluso discernir entre infecciones naturales o respuestas vacunales para determinadas enfermedades tal como lo hace una prueba individual (23).

## **OBJETIVOS**

El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de muestras de suero bovino en pools, , como herramienta para el monitoreo sero-epidemiológico de DVB, IBR, LEB y NC a nivel de hato en los estados de Chiapas, Guerrero, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz, utilizando pruebas de ELISA comerciales.

## MATERIAL Y METODOS

### Colección de muestras

Las muestras se obtuvieron de un muestreo nacional por parte del Banco Nacional de Suero Bovino (BNSB) del Departamento de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM). Los animales incluidos en el muestreo fueron hembras en edad reproductiva, mantenidas en pastoreo de plantas nativas para la producción de leche y doble propósito; ninguno de los hatos muestreados tenía antecedentes de vacunación.

El muestreo de los hatos se realizó durante los años 2009 a 2012 y se planeó un método de muestreo aleatorizado estratificado usando el número de hatos en el estado donde se localizaba el hato como referencia.

Para los estudios de sero-prevalencia se seleccionaron 506 hatos en regiones tropicales correspondientes a cerca del 60% del total del Padrón Ganadero Nacional (Cuadro 1)

**Cuadro 1.- Total de municipios y hatos muestreados en cada estado.**

Estados	Número de municipios muestreados	Número de hatos muestreados
Chiapas	15	97
Guerrero	16	98
Tabasco	15	131
Tamaulipas	15	89
Veracruz	28	91
Total	89	506

No todos los municipios fueron muestreados en los estados, se realizó el muestreo en los que presentaban mayor densidad de población bovina.

De cada hato se obtuvieron 10 a 12 muestras de sangre por venopunción de la vena coccígea para obtener 10ml por animal. Las muestras se centrifugaron para

colectar el suero y fueron transportados a la FMVZ-UNAM en refrigeración (4-8°C). Alrededor del 15% del total de las muestras fueron enviadas como sangre entera bajo refrigeración y al momento de llegar al BNSB fueron centrifugadas. El tiempo entre el muestreo y el procesamiento de estas últimas fue de 2 a 3 días. Las muestras de suero fueron almacenadas a -20 °C hasta ser analizadas entre 2016 y 2017. Se descongelaron una vez para preparar los pools por hato, mezclando 100µl de cada muestra individual, para obtener un total de 506 pools (muestras de hato), que fueron analizados utilizando ELISAs comerciales.

#### Tolerancia a la dilución

Para examinar la tolerancia de detección de los kits ELISA al utilizar pools, se realizaron diluciones con muestras positivas; estas muestras presentaban lecturas de Densidades Ópticas (DO) más altas de acuerdo con los parámetros que se mencionan en los insertos de las pruebas del Cuadro 2. Los pools con valores positivos de cada una de las enfermedades de interés, independientemente de la región geográfica de procedencia, se agruparon en un único Pool Positivo (PP) para cada enfermedad. Los cuatro PP sin diluir se dispusieron como controles positivos y se diluyeron con PBS (amortiguador de solución salina con fosfato) en 120 microlitros para generar una dilución doble seriada y 3 diluciones decuples seriadas (1/2, 1/10, 1/100 y 1/1000). Una vez realizadas estas diluciones, se generaron graficas mediante el programa PAST v3.20 para determinar la dilución máxima tolerada por el kit para diagnosticar valores positivos a las enfermedades tomando como valor de referencia las DO establecidas en las pruebas ELISA (55).

#### ELISAs

Los ensayos ELISAs para DVB, IBR y LEB se realizaron con kits de los laboratorios IDEXX (IDEXX, USA) y para el caso de NC se utilizó un kit del laboratorio HIPRA (HIPRA, España). Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante (56–59). Los puntos para determinar el corte entre muestras positivas y negativas fueron específicos de cada kit de ensayo. Los parámetros y métodos para calcular porcentajes de unión o de inhibición se

encuentran especificados en el Cuadro 2. La lectura de las reacciones se llevó a cabo a una densidad óptica de 450nm utilizando el programa Gen5 (60).

**Cuadro 2.- Parámetros y puntos de corte para las pruebas de ELISA empleadas, de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes.**

Prueba de ELISA	Parámetro de medición	Cálculo para obtener los parámetros de medición	%Se	%Es	Puntos de corte		
					Positivo	Negativo	Sospechoso
DVB	Razón S/P	$S/P = (DO_{neg}) / (DO_{pos} - DO_{neg})$	96.3	100	>0.2	≤0.2	N/A
IBR	% de Bloqueo	$\% \text{ Bloqueo} = [(DO_{neg} - DO) / (DO_{neg})] * 100$	97.4	100	>55%	<45%	45-55%
LEB	Razón S/N	$S/N = (DO / DO_{neg}) * 100$	100	99.8	<40	≥40	N/A
NC	Porcentaje de Índice Relativo	$RI\% = [(DO_{neg}) / (DO_{pos} - DO_{neg})] * 100$	95.7	100	>10%	<6%	6-10%

**Cálculos realizados para obtener los valores positivos, negativos o sospechosos (si existían) para las pruebas ELISA. Al obtener los valores de las DO y calcularlos con los controles, se obtenían los valores que mencionaban los insertos de las pruebas. %Se: porcentaje de sensibilidad del ELISA, %Esp: porcentaje de especificidad del ELISA, S/P: sueros positivos, DO: densidades ópticas, DOneg: densidades ópticas negativas, DO-pos: densidades ópticas positivas, N/A: no aplica, S/N: sueros negativos, RI%: porcentaje de índice relativo.**

## Sero-epidemiología

Para conocer si un hato era positivo o negativo a las enfermedades bajo estudio, se realizó la evaluación de los pools correspondientes a cada uno de los 506 hatos seleccionados en este estudio siguiendo las instrucciones de los 4 ELISAs antes mencionados. Se realizaron mapas para geo-referenciar los municipios que eran positivos y negativos a las enfermedades.

Los resultados de los ELISAs se agruparon por estado y municipio en una base de datos y con esta base se calcularon las prevalencias por estado para cada enfermedad. Para este cálculo se utilizó la Prueba de Seguridad (Teorema de Bayes) que consta de una tabla de 2x2 para obtener los casos de pools Falsos positivos y Falsos negativos, así como los valores predictivos de la prueba Positivos y Negativos (VPP+ y VPP- respectivamente) utilizando la sensibilidad y especificidad (Se y Esp) de las pruebas ELISAs utilizadas.

## **RESULTADOS**

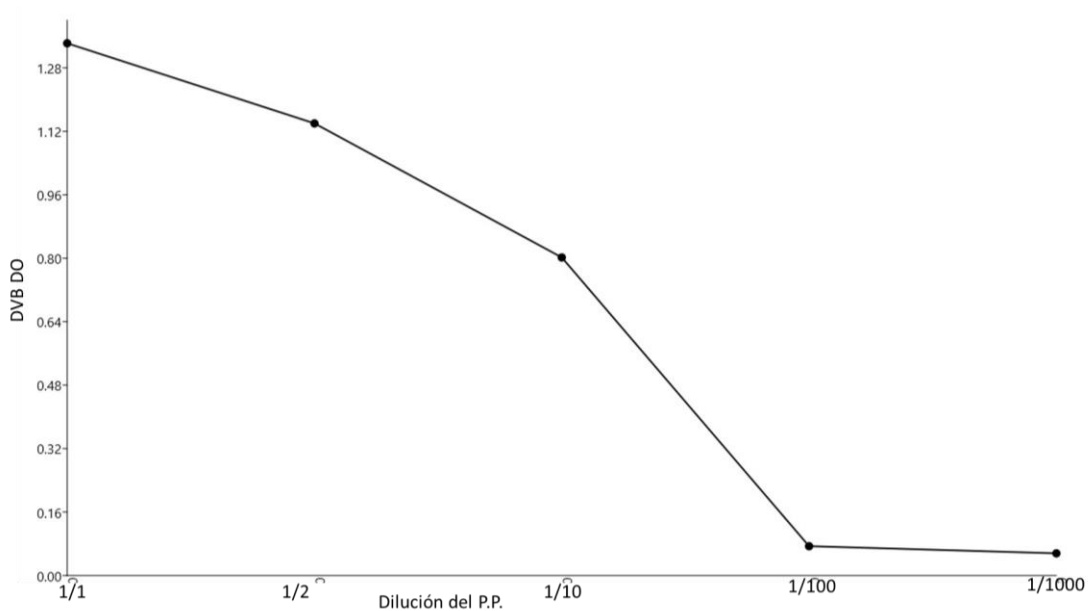
### Tolerancia a la dilución

Se demostró que, el uso de pools sirve para detectar a las muestras sero-positivas a las enfermedades de DVB, IBR y LEB en diluciones de al menos 1/10. De manera individual, IBR logró detectar anticuerpos hasta la dilución 1/100 y en NC solo los detectó en el PP. Todos los ELISAs empezaron a considerarse como positivas desde el PP y siguieron detectando a los anticuerpos hasta la dilución 1/10 en base a las DO establecidas por las normas del fabricante, asegurando que los resultados de la prueba son verídicos. En diluciones posteriores el crecimiento de las DO no fue tan marcado y dejó de dar una reacción positiva en las diluciones 1/100 para DVB y LEB y en 1/1000 para IBR.

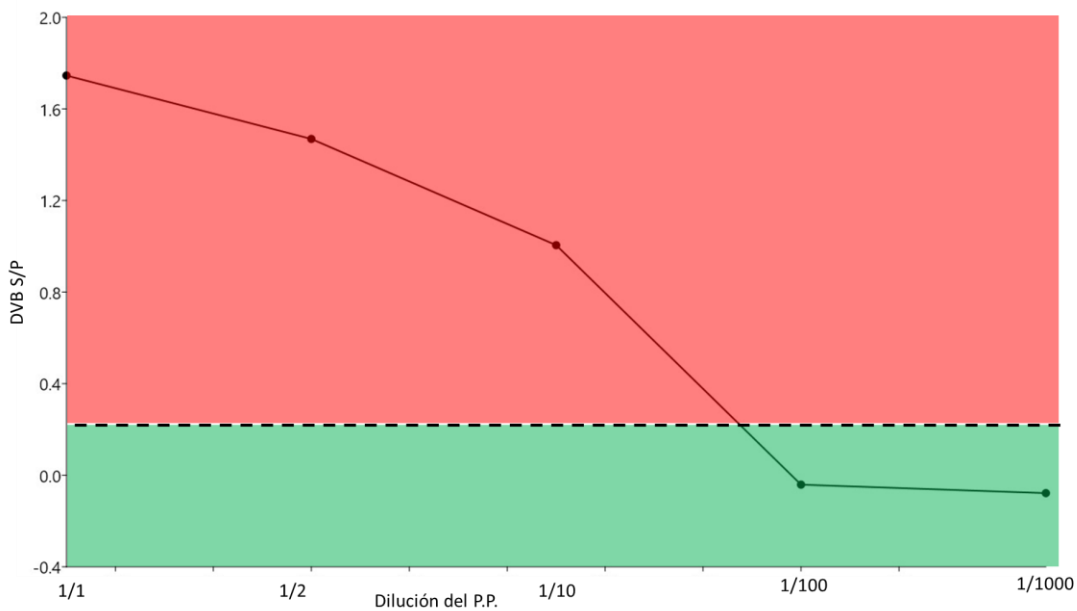
Las pruebas de IDEXX para el diagnóstico de DVB, IBR y LEB resultaron funcionar para la detección de anticuerpos contra las enfermedades mediante el uso de pools, por el contrario, la prueba de HIPRA no pudo detectar anticuerpos en los pools.

La prueba de DVB pudo detectar los resultados positivos desde el PP hasta la dilución 1/10, después de eso no detectaron resultados positivos. (Figura 1).



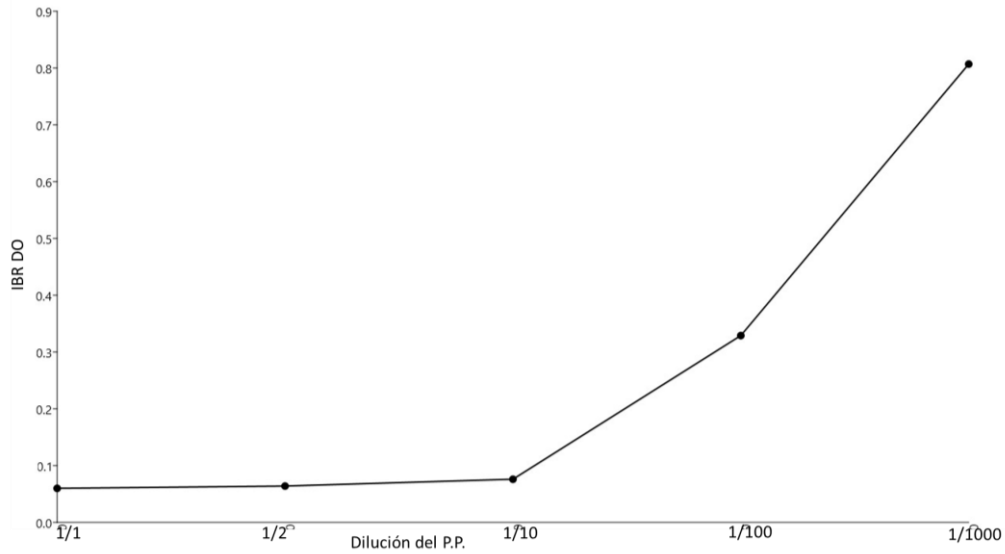


**Figura 1.- Densidad óptica de un suero bovino positivo para DVB en diluciones seriadas en una prueba ELISA. Conforme aumenta la dilución la lectura de densidad óptica disminuye hasta la dilución 1/100.**

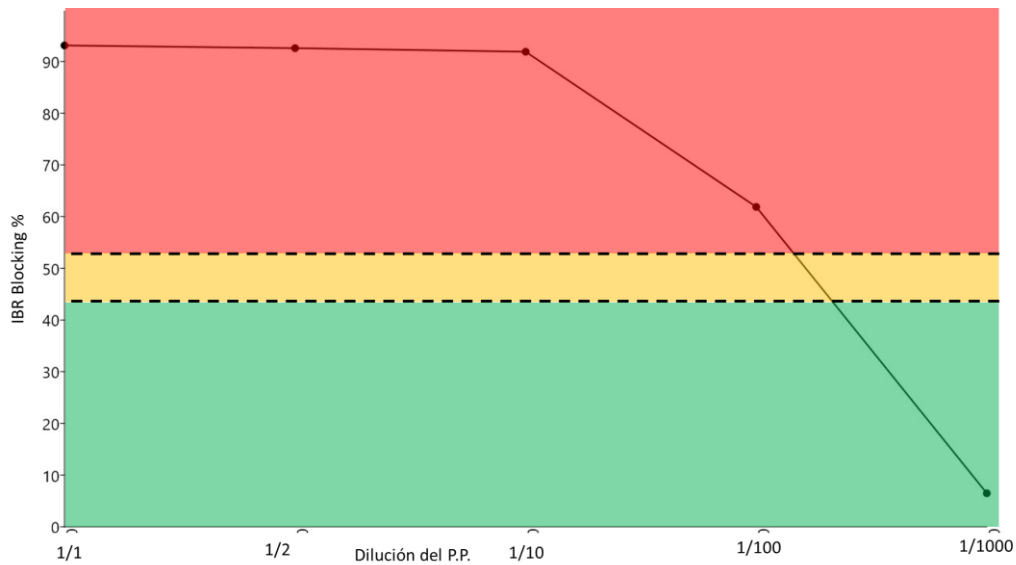


**Figura 2.- Gráfica de 5 diluciones para DVB. La zona de color blanca indica los valores que son detectados como positivos y la zona gris los valores detectados como negativos. El punto de corte se determinó mediante los parámetros de la prueba ELISA.**

La prueba de IBR pudo detectar resultados positivos desde el PP hasta la dilución 1/100, después no se pudo detectar un resultado positivo (Figura 3 y 4)

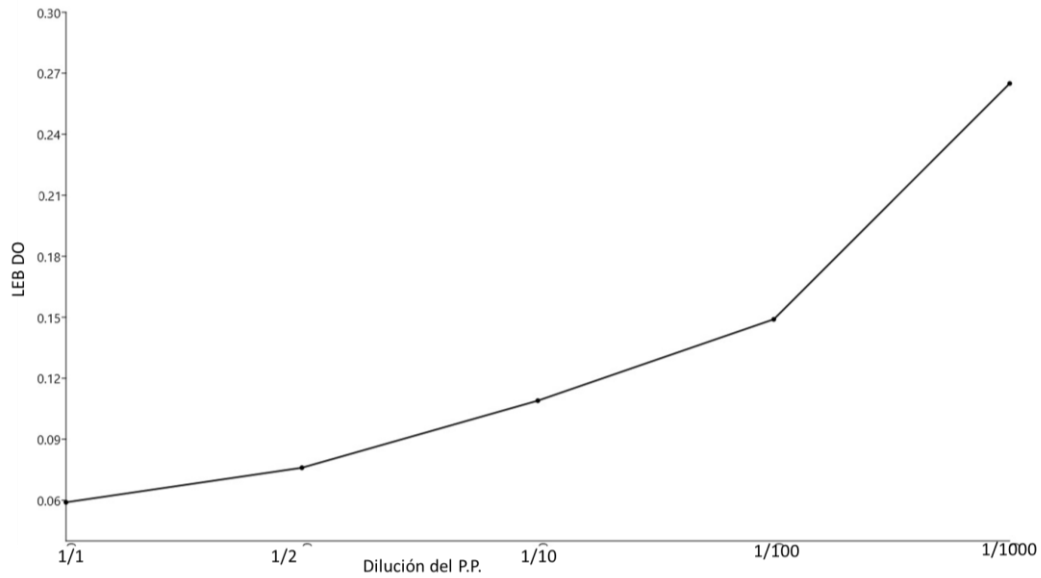


**Figura 3.-** Densidad óptica de un suero bovino positivo para IBR en diluciones seriadas en una prueba ELISA. Conforme aumenta la dilución la lectura de densidad óptica disminuye hasta la dilución 1/100.

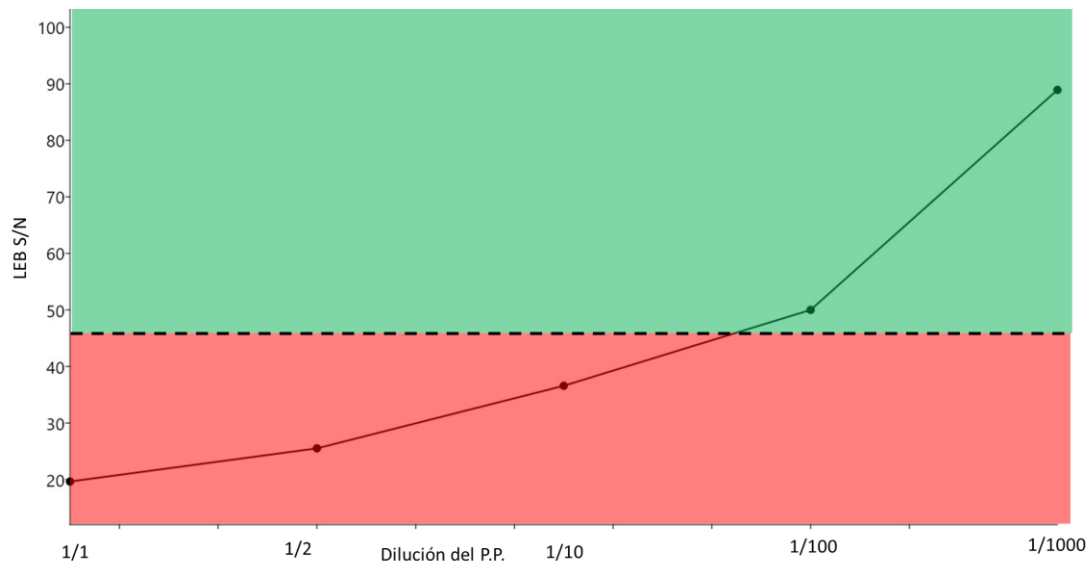


**Figura 4.-** Gráfica de 5 diluciones para IBR. La zona de color verde indica los valores negativos de la prueba ELISA la zona amarilla los valores sospechosos y la zona roja los valores positivos, las líneas punteadas son los puntos de corte de calificación de un valor a otro.

La prueba de LEB pudo detectar los resultados positivos desde el PP hasta la dilución 1/10, después de eso no detectaron resultados positivos. (Figura 3)

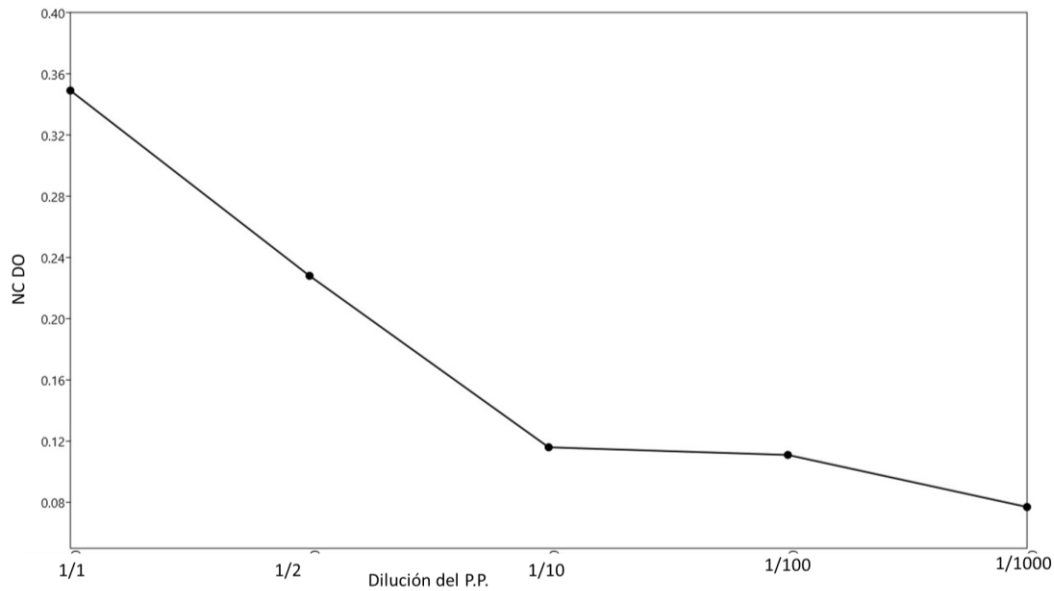


**Figura 5.- Densidad óptica de un suero bovino positivo para LEB en diluciones seriadas en una prueba ELISA. Conforme aumenta la dilución la lectura de densidad óptica disminuye hasta la dilución 1/100.**

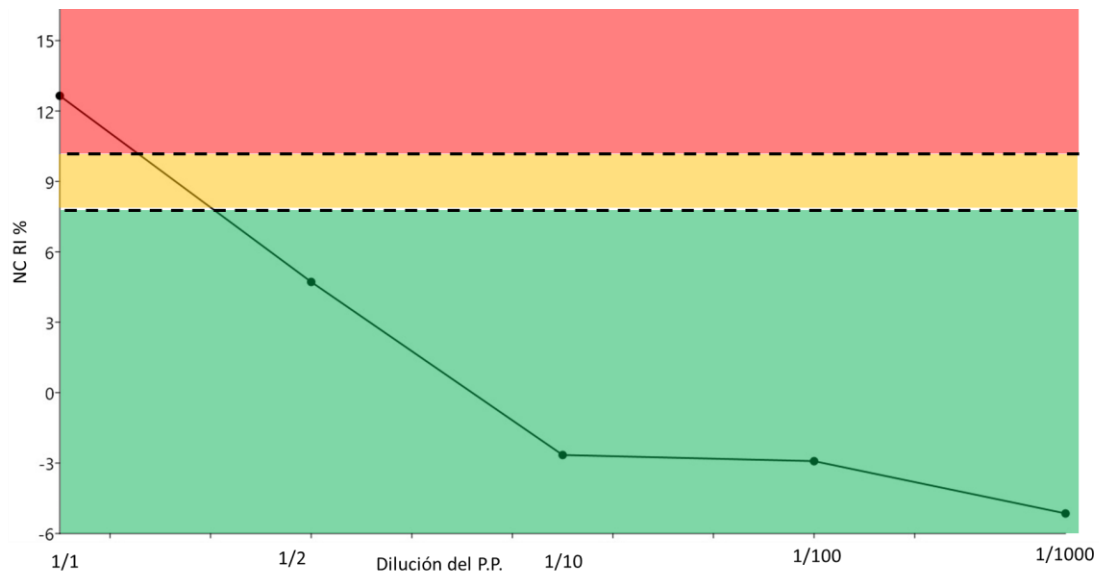


**Figura 6.- Gráfica de 5 diluciones para LEB. La zona de color verde indica los valores negativos de la prueba ELISA y la zona roja los valores positivos, la línea punteada es el punto de corte de calificación de positivo a negativo.**

La prueba de NC solo pudo detectar los resultados positivos desde el PP, no detectó resultados positivos en ninguna dilución. (Figura 4)



**Figura 7.- Densidad óptica de un suero bovino positivo para NC en diluciones seriadas en una prueba ELISA. Conforme aumenta la dilución la lectura de densidad óptica disminuye hasta la dilución 1/100.**



**Figura 8.- Gráfica de 5 diluciones para NC. La zona de color verde indica los valores negativos de la prueba ELISA la zona amarilla los valores sospechosos y la zona roja los valores positivos, las líneas punteadas son los puntos de corte de calificación de un valor a otro.**

## Estudios sero-epidemiológicos

La utilización de pools sirvió para identificar la prevalencia en los 5 estados tropicales. Se encontró que DVB presenta sero-prevalencias que van del 67.2% al 92.9%; para IBR las sero-prevalencias fueron del 87.6% al 97.7%; LEB presento unas sero-prevalencias del 16.4% al 68% y para NC las sero-prevalencias fueron del 6.9% al 60.2% (Cuadro 3).

**Cuadro 3.- Sero-prevalencias de los estados de Chiapas, Guerrero, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz para las enfermedades de DVB, IBR, LEB y NC, obtenidas por las pruebas ELISA; con intervalos de confianza al 95%.**

Estados	Prev DVB	Intervalo de confianza 95%	Prev IBR	Intervalo de confianza 95%	Prev LEB	Intervalo de confianza 95%	Prev NC	Intervalo de confianza 95%
Chiapas	82.4	0.73 a 0.88	87.6	0.79 a 0.92	68	0.58 a 0.76	42.3	0.32 a 0.52
Guerrero	92.9	0.85 a 0.96	90.8	0.83 a 0.95	41.8	0.32 a 0.51	60.2	0.5 a 0.69
Tabasco	67.2	0.58 a 0.74	97.7	0.93 a 0.99	21.4	0.15 a 0.29	6.9	0.03 a 0.12
Tamaulipas	78.6	0.69 a 0.85	89.9	0.81 a 0.94	25.8	0.17 a 0.35	29.2	0.2 a 0.39
Veracruz	86.8	0.78 a 0.92	94.5	0.87 a 0.97	16.4	0.1 a 0.25	51.6	0.41 a 0.61

Mediante los resultados de los ELISAs se calcularon las sero-prevalencias para cada estado y de cada enfermedad, así mismo se realizó un intervalo de confianza del 95%. Prev: Prevalencia.

La prueba de Seguridad mostró los resultados de los VPP+ y VPP-, así como las prevalencias aparentes y verdaderas para cada enfermedad. Se encontró que DVB tiene una sero-prevalencias del 64.7% al 86.7%, siendo Guerrero el estado en donde más hatos fueron identificadas como sero-positivos. En el caso de IBR las sero-prevalencias fueron del 85.4% al 92.9%, en el caso de Tabasco presento el mayor número de hatos positivos y fue la enfermedad que más se presentó en

todos los hatos. Para LEB las sero-prevalencias fueron del 16.5% al 68.3% y Chiapas fue el estado con más hatos positivos. Por último, para NC la sero-prevalencias fueron del 6.9% al 57.6%, nuevamente Guerrero fue el estado con mayor número de hatos positivos. (Cuadro 4 y 5).

**Cuadro 4.- Valores Predictivos positivos y negativos de las pruebas ELISA**

Estados	VPP+ DVB	VPP- DVB	VPP+ IBR	VPP- IBR	VPP+ LEB	VPP- LEB	VPP+ NC	VPP- NC
Chiapas	1	0.9	1	0.8	1	1	1	1
Guerrero	1	0.8	1	0.8	1	1	1	0.9
Tabasco	1	0.9	1	0.5	1	1	1	1
Tamaulipas	1	0.9	1	0.8	1	1	1	1
Veracruz	1	0.8	1	0.7	1	1	1	1

Valores predictivos de las pruebas ELISA, obtenidas por el teorema de Bayes, encontrando que solo la prueba de IBR presenta un VPP – de 0.5 y los demás con valores de 0.8 a 1, con lo que se asegura que los diagnósticos obtenidos son realmente positivos o negativos. VPP +: valor predictivo de la prueba positivo, VPP -: valor predictivo de la prueba negativo

**Cuadro 5.- Sero-prevalencias aparentes y verdaderas de las enfermedades estudiadas en los 5 estados de México.**

Estados	Prev Ap DVB	Prev Ver DVB	Prev Ap IBR	Prev Ver IBR	Prev Ap LEB	Prev Ver LEB	Prev Ap NC	Prev Ver NC
Chiapas	79.4	82.5	85.4	87.6	68.4	68	35.3	36.9
Guerrero	86.7	92.9	88.5	90.8	42.4	41.8	57.6	60.2
Tabasco	64.7	67.2	95.2	97.7	21.5	21.4	6.6	6.9
Tamaulipas	75.7	78.7	87.6	89.9	26	25.8	28	29.2
Veracruz	83.6	86.8	92	94.5	16.5	16.7	49.4	51.6

Prevalencias aparentes y verdaderas obtenidas con las pruebas de ELISA en el muestreo realizado en el año de 2012 en los 5 estados antes mencionados. Prev Ap : Prevalencia aparente de las enfermedades, Prev Ver : Prevalencia verdadera de las enfermedades.

Se generaron los mapas de los estados, mostrando los municipios evaluados, se representaron si eran positivos de color rojo o negativos con el color verde. Estos mapas están en la parte del Anexo de la tesis. Esto con la finalidad de resaltar como están distribuidas las enfermedades a lo largo de esos Estados (Anexos).

En todos los estados se presentó la asociación de DVB+IBR con un 33% de seroprevalencia seguido de la asociación de DVB+IBR+NC con un 17.19% y en tercer lugar DVB+IBR+LEB con un 13.44%. La asociación de enfermedades que menos se presentó en los hatos fue LEB+NC con un 0.20% de los hatos infectados. Solo el 0.99% de los pools fueron libres de las 4 enfermedades evaluadas (Cuadro 6).

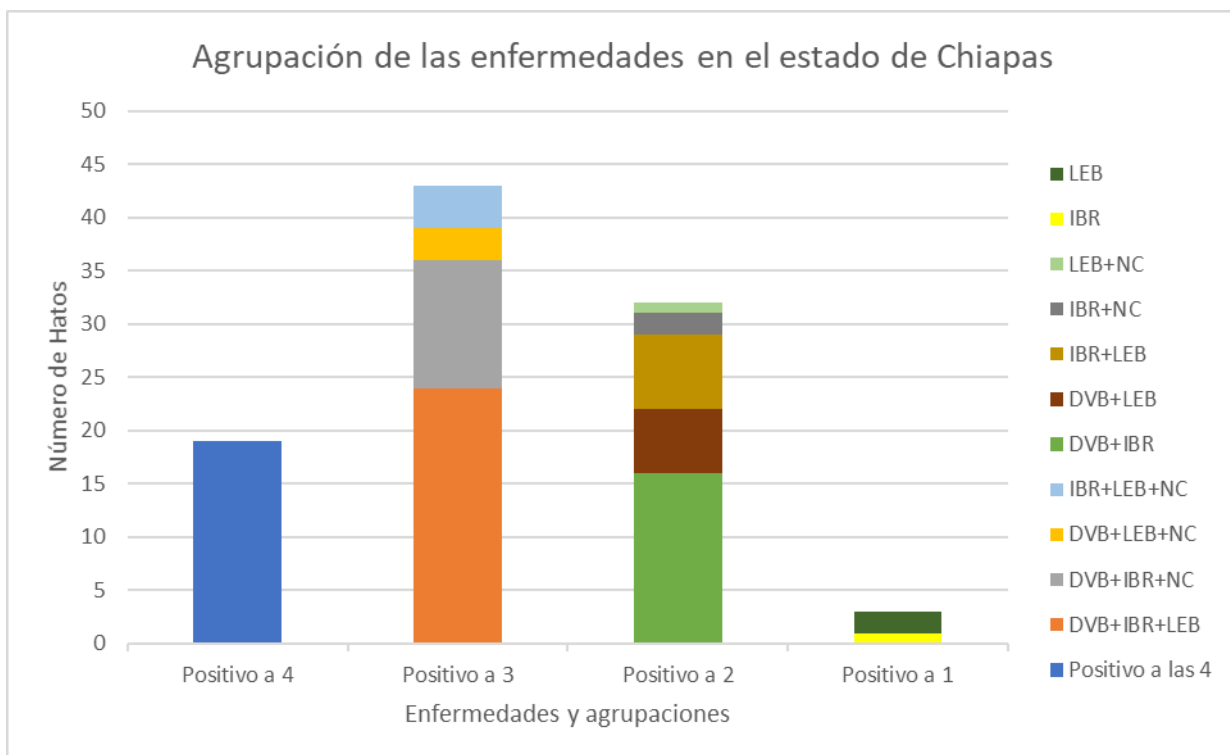
**Cuadro 6.- Resultados de asociaciones encontradas en los 5 estados evaluados.**

Asociaciones	CHI	GUE	TAB	TAM	VER	Total	Porcentaje
Cuatro Enfermedades	19	24	1	6	8	58	11.5
DVB+IBR+LEB	24	10	17	11	6	68	13.4
DVB+IBR+NC	12	24	6	14	31	87	17.2
DVB+LEB+NC	3	4	0	0	0	7	1.4
IBR+LEB+NC	4	0	0	1	1	6	1.2
DVB+IBR	16	24	63	34	30	167	33.0
DVB+NC	0	2	0	1	1	4	0.8
DVB+LEB	6	0	0	0	0	6	1.2
IBR+LEB	7	3	7	5	0	22	4.3
IBR+NC	2	1	1	2	5	11	2.2
LEB+NC	1	0	0	0	0	1	0.2
Una sola Enfermedad	3	6	35	11	9	64	12.6
Sin pools positivos	0	0	1	4	0	5	1.0
Total	97	98	131	89	91	506	100

Asociaciones encontradas en los estados de Chiapas, Guerrero, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz; se mencionan solo las asociaciones con mayor porcentaje de hatos positivos a las asociaciones.

Se observó que Chiapas tiene 19.59% de los hatos positivos a las 4 enfermedades, 44.33% positivas a 3 enfermedades, 32.99% positivas a 2

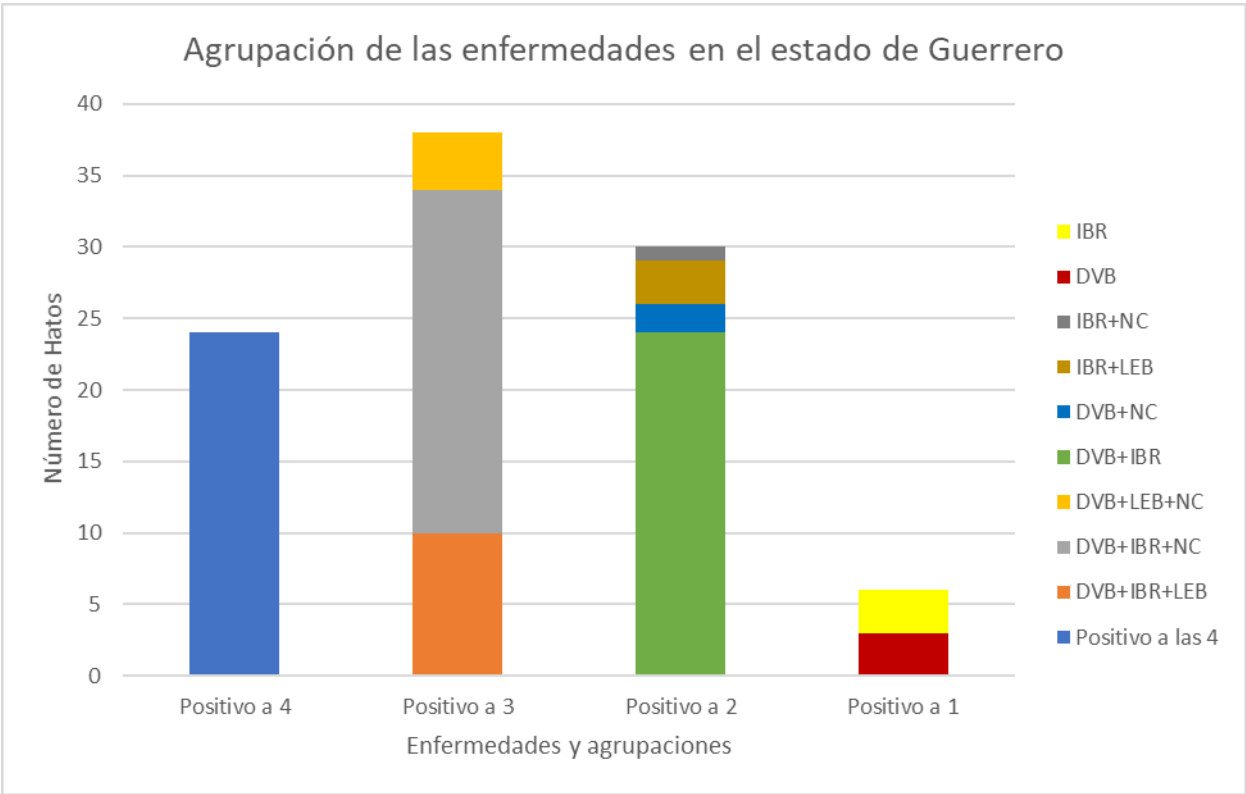
enfermedades y 3.09% positivas a una sola enfermedad. Se observó que IBR y DVB estuvieron presentes en los 4 conjuntos. (Figura 9)



**Figura 9: Columnas agrupadas mostrando el total de asociaciones de las enfermedades encontradas en el estado de Chiapas; cada color es representativo de una agrupación de enfermedades, enlistadas al lado derecho de la gráfica.**

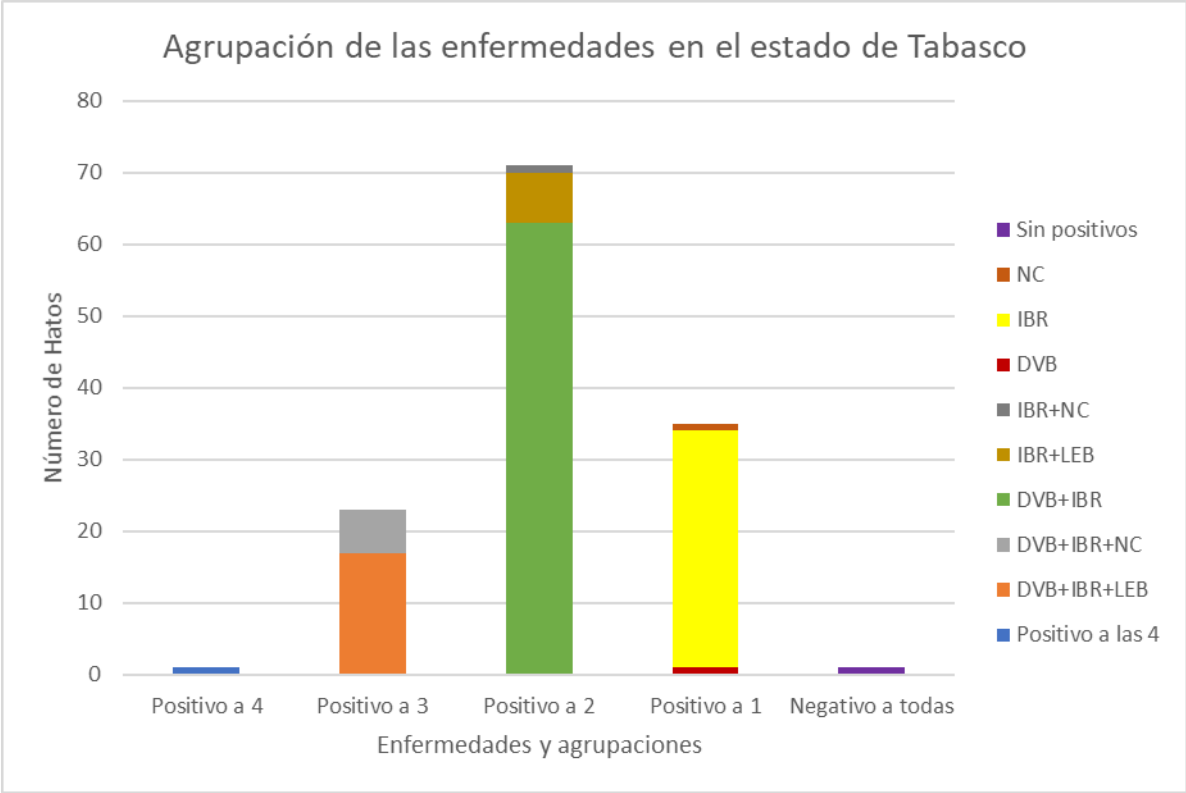


El estado de Guerrero tuvo el 24.49% de los hatos positivos a 4 enfermedades, 38.78% positivas a 3 enfermedades, 30.61% positivas a 2 enfermedades y el 6.12% positivas a una sola enfermedad; se observa que IBR y DVB están presentes en los 4 conjuntos. (Figura 10)



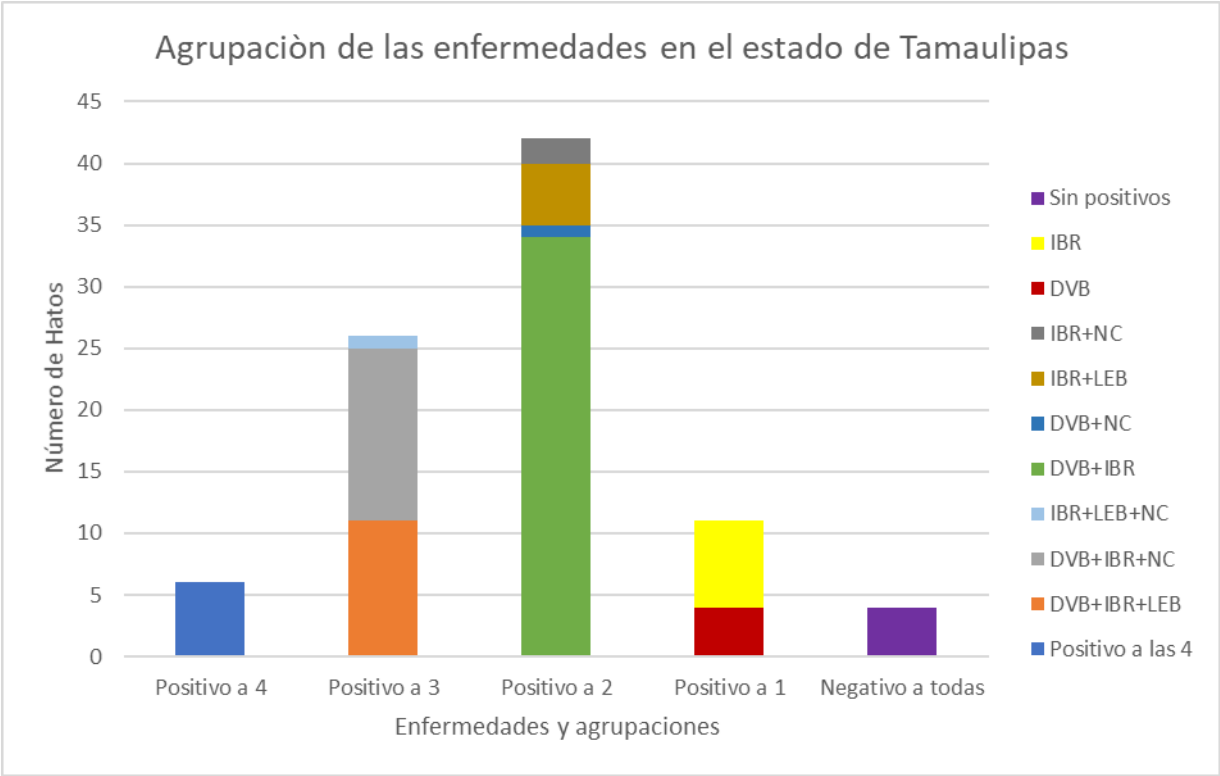
**Figura 10: Columnas agrupadas mostrando el total de asociaciones de las enfermedades encontradas en el estado de Guerrero; cada color es representativo de una agrupación de enfermedades, enlistadas al lado derecho de la gráfica.**

Tabasco presentó el 0.76% de los hatos positivos a 4 enfermedades, 17.56% positivas a 3 enfermedades, 54.20% positivas a 2 enfermedades, 26.72% positivas a una sola enfermedad y el 0.76% fue negativa a todas las enfermedades; se observó que IBR estuvo presente en los 4 conjuntos (Figura 11)



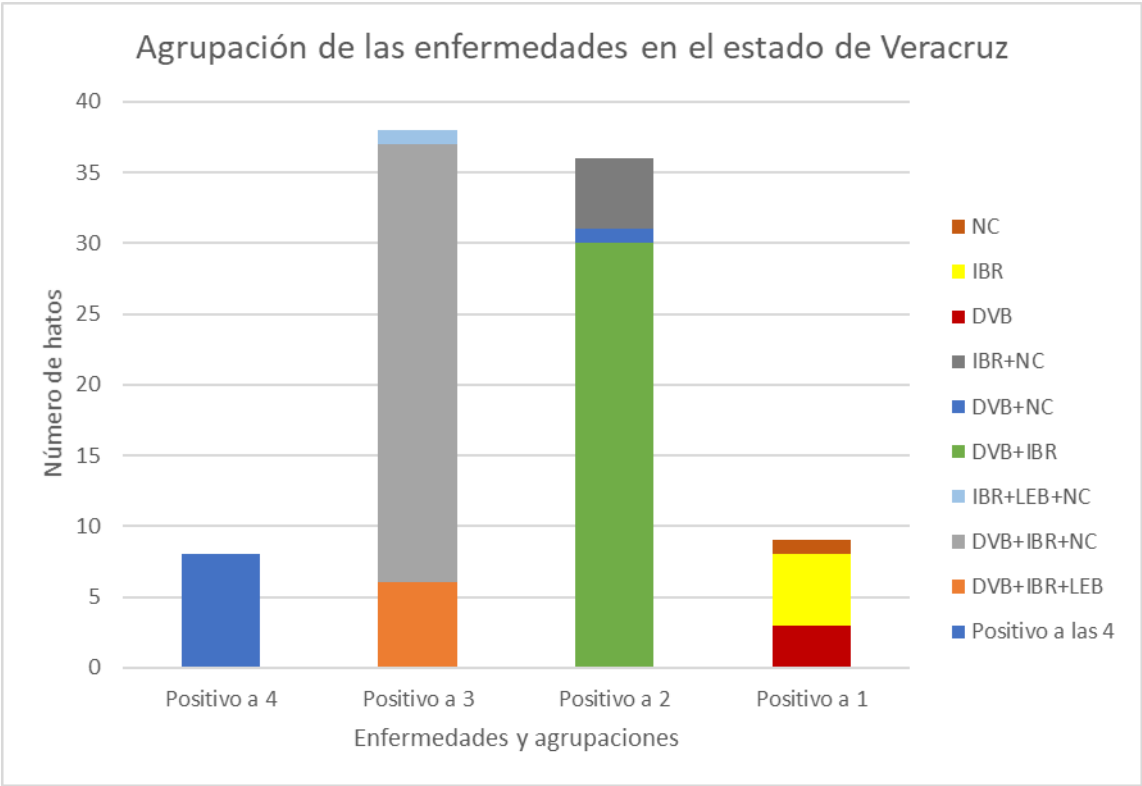
**Figura 11: Columnas agrupadas mostrando el total de asociaciones de las enfermedades encontradas en el estado de Tabasco; cada color es representativo de una agrupación de enfermedades, enlistadas al lado derecho de la gráfica.**

En el estado de Tamaulipas se obtuvo que el 7.87% de los hatos eran positivos a las 4 enfermedades, el 29.21% positivas a 3 enfermedades, 46.07% positivas a 2 enfermedades, 12.36% positivas a una sola enfermedad y 4.49% fueron negativas a todas las enfermedades; se observa que IBR y DVB estuvieron presentes en los 4 conjuntos. (Figura 12).



**Figura 12:** Columnas agrupadas mostrando el total de asociaciones de las enfermedades encontradas en el estado de Tamaulipas; cada color es representativo de una agrupación de enfermedades, enlistadas al lado derecho de la gráfica.

Y finalmente el estado de Veracruz tuvo 8.79% de los hatos positivos a 4 enfermedades, 41.76% positivas a 3 enfermedades, 39.56% positivas a 2 enfermedades y 9.89% positivas a una sola enfermedad, se observa que IBR, DVB y NC estuvieron presentes en los 4 conjuntos. (Figura 9)



**Figura 13: Columnas agrupadas mostrando el total de asociaciones de las enfermedades encontradas en el estado de Veracruz; cada color es representativo de una agrupación de enfermedades, enlistadas al lado derecho de la gráfica.**

Cada estado obtuvo resultados diferentes de las asociaciones que se observaron; en la mayoría de estas se encontraba presente IBR y DVB, seguidas de LEB y NC. También se observó que de manera regular las enfermedades se presentaban en asociaciones de 2 o de 3 enfermedades. DVB+IBR fue la que más se presentó en los hatos, seguida de DVB+IBR+NC y en tercer lugar DVB+IBR+LEB. La asociación que se presentó de forma menos común en todos los hatos fue la de NC+LEB.

## DISCUSIÓN

El estudio demostró que los pools son un método de muestreo útil para identificar hatos sero-positivos a las enfermedades virales de DVB, IBR y LEB, además de poder ser utilizados como un método de vigilancia del estado de salud, haciendo más eficientes y económicas las evaluaciones. Por otro lado, la prueba de NC solo obtuvo resultados positivos en el PP sin diluir, por lo que, si se realiza una evaluación mediante pools, esta ELISA no dará resultados confiables.

El uso de pools es útil ya que no discrimina el tipo de producción (carne, leche y doble propósito), se puede muestrear en cualquier momento, se reducen los costos de las pruebas y sirve como método de monitoreo de las enfermedades. En base a los resultados obtenidos, las pruebas ELISA parecen ser más sensibles al momento de detectar anticuerpos contra agentes virales que a los anticuerpos contra parásitos; por lo menos en animales que habitan en el trópico.

### Tolerancia a la dilución

Se demostró que se puede diagnosticar positivo a un pool de suero con poca cantidad de anticuerpos como es el caso de IBR que registro las reacciones positivas hasta en la dilución 1/100.

El uso de sueros es un muestreo más incluyente, en comparación a la evaluación de muestras de tanque de leche (que es más usada para la evaluación de pools), debido a que el tanque solo recibe a los animales que estén en la etapa de lactación, dejando excluidos a las becerras, novillas, vacas secas y sementales; aunado a esto, en los hatos de ganado de carne es imposible obtener una muestra de leche por lo que se discriminaría a todo ese hato

De manera general las pruebas ELISA que utilizan pools, están dirigidas a enfermedades que generan una memoria humoral de larga duración y que pueden medirse mediante muestras de tanque de leche ya que la glándula mamaria libera anticuerpos al momento del parto y mantiene una liberación constante de estos durante toda la lactación; además se observó que aunque los individuos no

presentaran sinologías de las enfermedades en el momento del muestreo, la detección de estas se logró encontrarse mediante el uso de pools (61).

Reportes previos (30,62,63) mencionan que el uso de pools para la detección de las enfermedades aquí estudiadas es útil y sirve para conocer el estado de salud del hato; así mismo se menciona que no se recomienda utilizar solo un tipo de muestra a menos que se tenga un reporte previo del estado de salud del hato (64–66). Con los resultados obtenidos se observa que la utilización de pools permite identificar sueros positivos a enfermedades virales. En este experimento solo se comprobaron 4 tipos de diluciones, pero puede ser que se detecten los sueros positivos a otros tipos de diluciones intermediarias de 1/10 a 1/100; al aumentar las diluciones tratamos de representar un aumento del número de animales en un pool, esto servirá para ver cuál es el máximo de animales que puede detectar una prueba diagnóstica en forma de pool; sin embargo se requiere de valores medios y bajos de PP para ver el potencial de los pools para estas enfermedades.

Para la DVB se utiliza el método de pools con muestras de leche, llegando a detectar a un animal positivo en mezcla de 25 animales; estudios realizados en Noruega y Escandinavia para conocer si la DVB estaba presente en los hatos mediante ELISAs indirectas usando pools de suero de bovinos con edades que iban de 8 a 12 meses de edad, reportaron que este tipo de muestreo permite detectar a la mayoría de los anticuerpos contra el virus en pools de suero de 5 individuos y en pools de tanque de leche de 25 individuos (67).

Con nuestro experimento se pudo demostrar que al menos en una dilución de 1/10 es posible encontrar pools positivos a DVB, se necesitan más repeticiones de esta dilución con valores del PP de valores medios y bajos para poder identificar el punto mínimo y medio de detección; no solo para esta enfermedad si no para las demás.

Para el diagnóstico de IBR se utilizan las muestras de tanque de leche de 500 individuos, estos estudios se realizaron en Dinamarca; para conocer la prevalencia de la enfermedad. Para comprobar si sus resultados de la prevalencia eran

verdaderos, realizaron una ELISA que evaluaba suero hiperinmune contra IBR en dilución de 1/500; encontrando los mismos resultados de detección (68,69). En Hungría se buscaba conocer la prevalencia en hatos mediante muestras de leche de tanque; encontraron que en muestras de leche de 150 animales aún es posible detectar los anticuerpos (65).

Para IBR se observó que los pools daban un resultado positivo hasta la dilución 1/100; en otros estudios (70,71) se observó que la detección de los anticuerpos es posible incluso en diluciones más altas, haciendo que este método pueda ser utilizado para monitorear la presencia de la enfermedad (72,73).

Para LEB se detectaron resultados positivos hasta dilución 1/10 utilizando un ELISA que detecta a la gp51 (la OIE menciona que las técnicas deberán centrarse en la detección de gp51) (74). Para el diagnóstico de LEB se utiliza de forma común las muestras de suero individual; en Suecia se realizaron estudios para validar el uso de la técnica de ELISA como diagnóstico de hato; se encontró que mezclando suero de 1 animal positivo con 25 sueros negativos era posible detectar los anticuerpos contra LEB (75). A pesar de que nuestra dilución no se asemeja a los experimentos mencionados, podemos observar que entra en un rango en el cual también nuestro pool puede ser detectado como positivo.

Los resultados obtenidos en el ELISA de NC sugieren que no es posible detectar a los pools positivos, pudiendo deberse a que el tipo de anticuerpos que se generan contra la enfermedad no son de vida larga o debido a que los ELISAs para diagnosticar a NC son en su mayoría de tipo indirecto por lo que se requiere una dilución previa para poder detectar a los anticuerpos. En nuestro estudio de NC al diluir el PP con PBS y después volver a diluir como menciona el fabricante pudo causar que no se detectara al anticuerpo, por lo que sería conveniente reajustar la dilución que se aplica a la prueba y conocer el punto de corte idóneo para conocer si un pool es positivo o no (76).

En el caso de NC, el ELISA indirecto que utiliza muestras de suero emplea preparaciones antigénicas no específicas contra taquizoitos y éstas no generan un

buen reconocimiento. La literatura recomienda el uso de excretas individuales o en pools ya que permiten detectar con facilidad a los taquizoitos; también menciona la utilización de muestras de leche de tanque, ya que contienen concentraciones elevadas de anticuerpos permitiendo evaluar el estado de salud del hato; sin embargo, la cantidad de leche usada para los pools varía la sensibilidad de la prueba. Se menciona que, en una muestra de tanque de leche con 100 individuos, aun es posibles detectar anticuerpos contra los taquizoitos (76,77). Debido a lo mencionado en la literatura, este ELISA no permite detectar a los sueros positivos están en forma de pools, pero si detecta a los individuos sero-positivos a la enfermedad.

#### Estudios sero-epidemiológicos

IBR es la enfermedad que más se presenta en los 5 estados evaluados, ya sea de manera sola o en conjunto con otras enfermedades. La presencia de anticuerpos contra el BHV-1 en ganado no vacunado ha sido reportado en varios países de alrededor del mundo; por ejemplo, en Canadá se reporta una sero-prevalencia del 20,4% en vaquillas y vacas; en Costa Rica la sero-prevalencia individual es del 48% en ganado de doble propósito; del 67% en Venezuela y del 35% en Uruguay; en Ecuador se menciona una sero-prevalencia del 43,2% en ganado lechero y de doble propósito. En México existen reportes en varios estados de la sero-prevalencia de BHV-1 en ganado no vacunado, como Michoacán, donde se reportan sero-prevalencias individuales en vacas lecheras del 22%. En Yucatán hay reportes del en 54,4% y en la región tropical húmeda en 89,8% (34).

En el caso de IBR la causa de que la enfermedad este diseminada en todos los estados es debido a que no se eliminan a los animales infectados, ya que estos generan nuevas infecciones en los hatos; así mismo algunos factores de riesgo que se mencionan en las investigaciones son el hacinamiento de los animales, el libre pastoreo, la no vacunación y la adquisición de nuevos animales sin conocer su estado de salud (34,78).



DVB es la segunda enfermedad más diseminada en los 5 estados evaluados. En un reporte realizado en Irlanda para detectar la prevalencia de DVB, se evaluaron 305 hatos con muestras de leche de tanque mediante ELISAs indirectas, encontrando una prevalencia del 79.6% (79). En Hungría se realizó otro estudio para conocer la prevalencia en hatos de leche y de carne usando también ELISAs indirectas con muestras de tanque de leche y pools de sueros de bovinos de 150 animales, encontrando una prevalencia del 79% (65). En México, el estado de Aguascalientes realizó un estudio en 23 hatos, reportando una sero-prevalencia del 58% (24). Reportes similares realizados en México, mencionan que en el estado de Michoacán existe una sero-prevalencia del 98.4% y en el estado de Yucatán del 14% (25,80).

Un estudio llevado a cabo en Irlanda para conocer los factores de riesgo que permiten que la DVB se mantenga en los hatos realizó un muestreo en 3894 hatos positivos a la enfermedad; dicho estudio menciona que los animales son más susceptibles para contraer la enfermedad si se encuentran en hacinamiento, alimentados bajo pastoreo y no reciben vacunaciones (81). Con los resultados obtenidos en el experimento, podemos ver que la sero-prevalencia encontrada en los 5 estados tropicales evaluados es mayor a los reportados en otros países no tropicales, pudiendo deberse a que esta enfermedad se transmite de una forma sencilla entre animales por medio de aerosoles o al consumir placentas infectadas; aunado a esto el tipo de producciones que se tienen en los trópicos facilitan aún más la diseminación por la falta de registros médicos o medidas preventivas para el ingreso de esta enfermedad.

LEB es la tercera enfermedad más diseminada en los hatos evaluados, siendo Chiapas el estado con mayor número de hatos positivos a la enfermedad. Lituania en 1990 realizó estudios para conocer la sero-prevalencia de sus hatos encontrando que era del 7.29% En México existen varios estudios serológicos que han investigado la persistencia de esta infección en el ganado a nivel nacional, reportando tasas de sero-prevalencia que van del 11 al 66%. Este virus puede

afectar las funciones generales del sistema inmune predisponiendo a los animales a coinfecciones y puede aumentar la gravedad de las infecciones.(43,82).

No existen factores de riesgo ecológicos que permiten mantener la seroprevalencia de LEB (clima, tipo de suelo), dado que la infección se asocia generalmente con las prácticas de manejo relacionadas con la compra de ganado y el uso de objetos que son contaminados con sangre. Por lo que LEB se mantiene en los hatos debido al uso de una misma aguja en varios animales para aplicar medicamentos, al no desinfectar el material de cirugías, por comprar animales sin conocer su estado de salud y por no eliminar a los animales positivos (83,84). Una alternativa viable para reducir la transmisión de LEB es el eliminar a los animales con pruebas positivas a la enfermedad, ya que este virus se mantendrá en el individuo durante toda su vida e infectando a otros animales (83).

En el caso de NC, fue la enfermedad menos diseminada en los hatos evaluados. En México se han realizado estudios en los estados de Coahuila, Chihuahua, Hidalgo, Querétaro y Jalisco en donde se analizaron 20 hatos (813 muestras de sangre) mediante pruebas de ELISA, encontrando una prevalencia del 42% (24,51). Otro estudio realizado en el estado de Aguascalientes evaluó 13 hatos de producción lechera (187 muestras individuales de sangre diluidas a 1/100), mediante ELISAs, encontrando una prevalencia del 59% (85).

La literatura menciona que la prueba de ELISA sirve para poder detectar a los animales positivos, incluso hay ELISAS que se pueden utilizar mediante pools, sin embargo, estas están diseñadas para ser usadas con muestras de heces. Por esta razón puede que nuestras prevalencias obtenidas no sean como las reportadas en otros estudios. Para NC los principales factores de riesgo que existen son el hacinamiento de animales, la presencia de perros en las instalaciones y no eliminar a los animales P.I. (86).

Las asociaciones que se pudieron observar son reportadas en otros estudios (87,88) de forma común, como es el ejemplo de IBR o DVB con cualquier otra enfermedad. Esto debido a que estos virus causan un daño en el epitelio

respiratorio y reproductivo además de una disminución del sistema inmune, permitiendo que cualquier otra infección (bacteriana, viral o parasitaria) pueda desarrollarse en el individuo (51,63). Risalde (2013) encontró que la asociación de IBR+DVB causó siempre un daño en el tejido uterino (68,89). En estudios realizados en Aguascalientes se demostró que, aun cuando solo este el virus de IBR en el organismo, este permitirá que otras enfermedades ingresen y proliferen, como es el caso de *Brucella abortus* o DVB, incluso llegando a tener la asociación de las tres enfermedades (5). En el caso de DVB que se localiza en el tejido linfóide, causa una inmunosupresión y alteración de las funciones de las células de defensa con lo que se permite que las demás enfermedades se diseminen en el cuerpo incluso llegando a permitir que NC se multiplique (24).

Los resultados muestran que IBR mantiene una prevalencia elevada en todos los estados evaluados, siendo la enfermedad más distribuida en estos; a su vez, presenta asociaciones elevadas con las otras enfermedades presentándose en todos los hatos y municipios, con todas las enfermedades, pero más común con DVB. Un aspecto importante de la infección con el virus de la DVB es su afinidad por el sistema inmune, principalmente sobre células mitóticamente activas como los linfocitos; de manera que una de sus principales características es la inmunosupresión y la infección mixta o secundaria con otros patógenos. En este caso, básicamente por un fenómeno de reactivación del virus de IBR, se realiza una sinergia entre ellos, causando así que las asociaciones más observadas sean las de DVB+IBR o en conjunto con otra enfermedad (24).

Todos los estados evaluados presentan sero-prevalencias elevadas comparándolas con otros países en donde se han hecho estas evaluaciones. Comparando nuestros resultados, podemos observar que todos los factores de riesgo que se mencionan para las enfermedades también se presentan en los hatos de los cinco estados que nosotros evaluamos (iatrogenias, aerosoles o reservorios, perros alrededor de los animales, zonas de pastoreo en donde no existe un control de ingreso de animales enfermos, entre otras). Nuestro país no realiza las medidas de control necesarias para estas enfermedades. Aunque

comparten similitudes en cómo se diseminan, existen pocas medidas de control que los hatos llevan a cabo; manteniendo así estas elevadas sero-prevalencias (68,90,91).

No obstante, con los resultados obtenidos no podemos asegurar que todos los animales que hayan padecido la enfermedad sean detectados en los pools, debido a que los PP utilizados eran altamente positivos; dejando fuera las detecciones de los sueros medianamente y bajo positivos; esto debido a que no se contaban con más pruebas ELISAs y no se pudieron llevar a cabo. Un experimento en donde se utilicen los pools medianamente y bajo positivo será de importancia para poder identificar a cualquier animal sero-positivo en los pools. En los países donde se utilizan los pools como herramienta de monitoreo, se menciona que se debe complementar con otras pruebas para así confirmar la sero-prevalencia de ese lugar y con reportes previos basarnos para las nuevas evaluaciones (61,92) . Por los tipos de ELISAs que se utilizaron no se pudieron obtener la cuantificación de los anticuerpos en los sueros evaluados, por lo que los valores positivos y negativos solo son valores cualitativos para estos resultados. Se recomienda que estas pruebas se realicen en hatos que tengan un historial de evaluaciones contra esas enfermedades, esto con la finalidad de saber si la enfermedad se mantiene en los hatos o ha disminuido o en hatos registrados como libres de la enfermedad para asegurar que mantengan ese estatus.

## **CONCLUSIONES**

La utilización de pools como un método de monitoreo sero-epidemiológico a nivel de hato es asequible para enfermedades como DVB, IBR y LEB y podría ser integrada en un programa de monitoreo nacional. Esta información podría utilizarse para apoyar el asesoramiento en la gestión de la salud del hato al ser proporcionado a los veterinarios. Así mismo, se puede utilizar para la determinación de la prevalencia de las enfermedades antes mencionadas.

Los pools de NC tuvieron una baja sensibilidad y, por lo tanto, no se recomienda la utilización de estos para el diagnóstico serológico con el ELISA utilizado en este estudio, haciendo ver que las muestras individuales o fuentes alternativas, como las muestras de heces, pueden ser más apropiadas para el diagnóstico de esta enfermedad.

Un conocimiento del agente y de la dinámica de la enfermedad debe dictar el uso de los pools como herramientas de supervisión sero-epidemiológica

Las sero-prevalencias muestran que la falta de vacunación y de registros clínicos permiten que las enfermedades reproductivas se diseminen con más facilidad, por lo que las medidas de bioseguridad dentro de los hatos (como la eliminación de animales positivos a las enfermedades y la vacunación oportuna) deben de llevarse a cabo para evitar nuevas infecciones.

## REFERENCIAS

1. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 5]. Available from: <http://www.fao.org/animal-production/en/>
2. Rojo-Rubio R, Vázquez-Armijo JF, Pérez-Hernández P, Mendoza-Martínez GD, Salem AZM, Albarrán-Portillo B, et al. Dual purpose cattle production in Mexico. *Trop Anim Health Prod.* 2009;41(5):715–21.
3. INEGI. Encuesta Nacional Agropecuaria 2014 Producción de ganado bovino. 2014;5–6. Available from: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/encuestas/agropecuarias/ena/ena2014/>
4. SAGARPA. Boletín de Leche 2018. 2018;64.
5. Meléndez Soto RM, Flores AGV, Muñoz EJR, Aparicio ED, Segura-Correa JC, Barrera ALG. Factores de riesgo asociados a la presencia de aborto y desempeño reproductivo en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Rev Mex Ciencias Pecu.* 2010;1(4):391–401.
6. Mensual A, Producción. Carne en canal de bovino. 2018;2005:22–3.
7. Newcomer BW, Givens D. Diagnosis and Control of Viral Diseases of Reproductive Importance: Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Viral Diarrhea. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 2016;32(2):425–41.
8. Schisterman EF, Vexler A. To pool or not to pool, from whether to when: Applications of pooling to biospecimens subject to a limit of detection. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2008;22(5):486–96.
9. Weinberg CR, Umbach DM. Using Pooled. 1999;(September):718–26.
10. Malinovsky Y, Albert PS, Schisterman EF. Pooling Designs for Outcomes under a Gaussian Random Effects Model. *Biometrics.* 2012;68(1):45–52.
11. Singer RS, Cooke CL, Maddox CW, Isaacson RE, Wallace RL. Use of

- pooled samples for the detection of Salmonella in feces by polymerase chain reaction. *J Vet Diagnostic Investig.* 2006;18(4):319–25.
12. Munoz-Zanzi CA, Johnson WO, Thurmond MC, Hietala SK. Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhea virus persistently infected cattle. *J Vet Diagnostic Investig.* 2000;12(3):195–203.
  13. Kennedy JA, Mortimer RG, Powers B. Reverse transcription-polymerase chain reaction on pooled samples to detect bovine viral diarrhea virus by using fresh ear-notch-sample supernatants. *J Vet Diagnostic Investig.* 2006;18(1):89–93.
  14. Singer R, Cooke C, ... CM-J of, 2006 undefined. Use of Pooled Samples for the Detection of Salmonella in Feces by Polymerase Chain Reaction. *JournalsSagepubCom* [Internet]. 2006;325:319–25. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870601800401>
  15. El-Rashidy AA, Fox LK, Gay JM. Diagnosis of Staphylococcus aureus Intramammary Infection by Detection of Specific Antibody Titer in Milk. *J Dairy Sci* [Internet]. 1992;75(2):1430–5. Available from: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/75/6/1430>
  16. Soroka SD, Granade TC, Phillips S, Parekh B. The use of simple, rapid tests to detect antibodies to human immunodeficiency virus types 1 and 2 in pooled serum specimens. 2003;27. Available from: [https://ac-els-cdn-com.libproxy.clemson.edu/S1386653202001336/1-s2.0-S1386653202001336-main.pdf?\\_tid=da7e4c20-d84b-11e7-bb70-00000aab0f6c&acdnat=1512320784\\_e47c01b635cdc9e7fa8a12e69956c099](https://ac-els-cdn-com.libproxy.clemson.edu/S1386653202001336/1-s2.0-S1386653202001336-main.pdf?_tid=da7e4c20-d84b-11e7-bb70-00000aab0f6c&acdnat=1512320784_e47c01b635cdc9e7fa8a12e69956c099)
  17. Ackermann M, Müller HK, Bruckner L, Kihm U. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. *Vet Microbiol.* 1990;23(1–4):365–70.
  18. Givens MD, Marley MS. Immunology of chronic BVDV infections. *Biologicals* [Internet]. 2013;41(1):26–30. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.06.003>

19. Larson R, Grotelueschen D, Brock K, Hunsaker BD, Smith R, Sprowls R, et al. Bovine Viral Diarrhea (BVD): Review for beef cattle veterinarians. *Bov Pract.* 2004;38(1):93–102.
20. Baker JC. The Clinical Manifestations of Bovine Viral Diarrhea Infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* [Internet]. 1995 Nov 1 [cited 2018 Oct 29];11(3):425–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072015304606>
21. Potgieter LN. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* [Internet]. 1995;11(3):501–20. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30464-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30464-3)
22. Greiser-Wilke I, Grummer B, Moennig V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals.* 2003;31(2):113–8.
23. Cowley DJB, Graham DA, Guelbenzu M, Doherty ML, More SJ. Aspects of bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus herd-level seroprevalence and vaccination in dairy and beef herds in Northern Ireland. *Ir Vet J.* 2014;67(1):1–5.
24. Sanchez Y, Rodriguez D, Pedroso M, Cuello S. Simultaneidad serológica de neospora caninum con brucella abortus y los virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en bovinos pertenecientes al Estado de Hidalgo , Mexico. *Rev Salud Anim.* 2012;34(2):95–100.
25. Solis-Calderon JJ, Segura-Correa VM, Segura-Correa JC. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. *Prev Vet Med.* 2005;72(3–4):253–62.
26. Gómez-Romero N, Basurto-Alcántara FJ, Verdugo-Rodríguez A, Bauermann F V., Ridpath JF. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus in cattle from Mexico. *J Vet Diagnostic Investig.* 2017;29(3):362–5.



27. Segura-Correa JC, Zapata-Campos CC, Jasso-Obregón JO, Martínez-Burnes J, López-Zavala R. Seroprevalence and risk factors associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in north-eastern Mexico. *Open Vet J.* 2016;6(2):143–9.
28. Magaña-Urbina A, Riveira JLS, Segura-Correa JC. Infectious bovine rhinotracheitis in dairy herds in the Cotzio-Tejaro region of Michoacan, México. *Téc Pecu Méx.* 2005;43(February):27–37.
29. Babiuk LA, Van Drunen Littel-Van Den Hurk S, Tikoo SK. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol.* 1996;53(1–2):31–42.
30. Cox GJ, Zamb TJ, Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol* [Internet]. 1993;67(9):5664–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28970971><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5622607><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8456302><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8350420><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.f>
31. Trangadia B, Rana SK, Mukherjee F, Srinivasan VA. Prevalence of brucellosis and infectious bovine rhinotracheitis in organized dairy farms in India. *Trop Anim Health Prod.* 2010;42(2):203–7.
32. Nuotio L, Neuvonen E, Hyytiäinen M. Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland. *Acta Vet Scand.* 2007;49(1):1–6.
33. Muratore E, Bertolotti L, Nogarol C, Caruso C, Lucchese L, Iotti B, et al. Surveillance of Infectious Bovine Rhinotracheitis in marker-vaccinated dairy herds: Application of a recombinant gE ELISA on bulk milk samples. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2017;185:1–6. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.01.003>
34. ROMERO-SALAS D, AHUJA-AGUIRRE C, MONTIEL-PALACIOS F,

- GARCÍA-VÁZQUEZ Z, CRUZ-ROMERO A, AGUILAR-DOMÍNGUEZ M.  
Seroprevalence and risk factors associated with infectious bovine rhinotracheitis in unvaccinated cattle in southern Veracruz , Mexico. *African J Microbiol Res.* 2013;7(17):1716–22.
35. Romero-Salas D, Cruz-Romero A, Aguilar-Domínguez M, Ibarra-Priego N, Barradas-Piña FT, Nogueira Domingues L, et al. Seroepidemiology of bovine herpes virus-1 infection in water buffaloes from the state of Veracruz, Mexico. *Trop Biomed.* 2018;35(2):541–52.
  36. Tabasco VDELOSEDE, Veracruz PY. *Revista científica.* 2018;XXVIII(5).
  37. Burny A, Bex F, Chantrenng H, Cleuter Y, Dekegel D, Ghysdael J, et al. Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. *Adv Cancer Res.* 1978;28(C):251–311.
  38. Barez PY, de Brogniez A, Carpentier A, Gazon H, Gillet N, Gutiérrez G, et al. Recent advances in BLV research. *Viruses.* 2015;
  39. Blagitz MG, Souza FN, Batista CF, Azevedo LFF, Sanchez EMR, Diniz SA, et al. Immunological implications of bovine leukemia virus infection. *Res Vet Sci.* 2017;114(August 2016):109–16.
  40. Pandey GS, Simulundu E, Mwiinga D, Samui KL, Mweene AS, Kajihara M, et al. Clinical and subclinical bovine leukemia virus infection in a dairy cattle herd in Zambia. *Arch Virol.* 2017;162(4):1051–6.
  41. Otta SL, Johnson R, Wells SJ. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med.* 2003;61(4):249–62.
  42. Polat M, Takeshima S, Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol J [Internet].* 2017;14(1):209. Available from: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-017-0876-4>
  43. Heinecke N, Tórtora J, Martínez HA, González-Fernández VD, Ramírez H.

- Detection and genotyping of bovine leukemia virus in Mexican cattle. *Arch Virol.* 2017;162(10):3191–6.
44. Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *J Comp Pathol* [Internet]. 2006;134(4):267–89. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997505001350>
  45. Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology.* 2006;133(3):261–78.
  46. Anderson ML, Anderson ML, Andrianarivo a G, Andrianarivo a G, Conrad P a, Conrad P a. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2000;60:417–31. Available from: [isi:000087788200033](http://www.isinet.com/doi/10.1016/S000877788200033)
  47. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(2):323–67.
  48. Martínez A, Moreno G, Cruz A. Actualización de la Neosporosis bovina. *Conex Agropecu JDC; Vol 2, No 1 Conex Agropecu JDC* [Internet]. 2013;49–66. Available from: <http://www.revistasjdc.com/main/index.php/conexagro/article/view/184>
  49. Cerqueira-Cézar CK, Calero-Bernal R, Dubey JP, Gennari SM. All about neosporosis in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria.* 2017.
  50. Medina L, Cruz-Vázquez C, Quezada T, Morales E, García-Vázquez Z. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. *Vet Parasitol.* 2006;136(3–4):187–91.
  51. Garcia-Vazquez Z, Rosario-Cruz R, Ramos-Aragon A, Cruz-Vazquez C, Mapes-Sanchez G. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Vet Parasitol.* 2005;134(1–2):61–5.
  52. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory

experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [Internet]. 2015;72:4–15. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>

53. Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Beiboer ML, Wouda W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet Parasitol.* 2003;110(3–4):161–9.
54. Larsen A, Corva S, Panei J, Geisler C, Mortola E. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using the Recombinant gp51 and p24 of Bovine Leukemia Virus for Immunodetection of the Disease. *Open J Anim Sci* [Internet]. 2017;07(03):241–53. Available from:  
<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ojas.2017.73019>
55. Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. [Internet]. Oslo: University of Oslo; 2001. Available from: <https://folk.uio.no/ohammer/past/>
56. IDEXX BVD [Internet]. [cited 2018 Jul 25]. Available from:  
<https://www.idexx.com/en/livestock/livestock-tests/ruminant-tests/idexx-bvdv-total-ab-test/>
57. IDEXX IBR [Internet]. [cited 2018 Jul 25]. Available from:  
<https://www.idexx.com/en/livestock/livestock-tests/ruminant-tests/idexx-ibr-gb-x3-ab-test/>
58. IDEXX LEB [Internet]. [cited 2017 Sep 29]. Available from:  
<https://www.idexx.com/en/livestock/livestock-tests/ruminant-tests/idexx-leukosis-blocking-ab-test/>
59. HIPRA *Neospora caninum* [Internet]. [cited 2017 Sep 29]. Available from:  
<https://www.hipra.com/portal/es/hipra/animalhealth/products/detail/civtest-bovis-neospora>
60. Biotek/ USA. Gen5 EPOCH [Internet]. 2013 [cited 2019 Aug 19]. Available from:

[https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.04.07\\_BVD.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.07_BVD.pdf)

61. Houe H, Lindberg A, Moennig V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagnostic Investig.* 2006;18(5):427–36.
62. Frössling J. Infection in Cattle Evaluation of diagnostic tests and herd studies. 2004;
63. Scott HM, Sorensen O, Wu JTY, Chow EYW, Manninen K, VanLeeuwen JA. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, *Neospora caninum*, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhoea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Can Vet J [Internet]*. 2006;47(10):981–91. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1571121&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
64. Kramps JA, Maanen C Van, Wetering G Van De, Stienstra G, Quak S, Brinkhof J, et al. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. *Vet Microbiol.* 1999;64(2–3):135–44.
65. Tekes L, Markos B, Kecskemeti S, Mehesfalvi J, Mate Z, Kudron E. Prevalence of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) infection in Hungarian cattle herds. *Acta Vet Hung [Internet]*. 1999;47(3):303–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497823>  
<http://www.akademiai.com/content/r85711782u461h64/fulltext.pdf>
66. Baszler T V, Adams S, Vander-schalie J, Mathison B a, Kostovic M. Validation of a Commercially Available Monoclonal Antibody-Based Competitive-Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of

Serum Antibodies to *Neospora caninum* in Cattle. *Society*.  
2001;39(11):3851–7.

67. Åkerstedt J, Mørk T. Surveillance programmes for terrestrial and aquatic animals in Norway: The surveillance programme for bovine virus diarrhoea ( BVD ) in Norway 2014. 2015;6.p.
68. Sayers RG, Byrne N, O’Doherty E, Arkins S. Prevalence of exposure to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) in Irish dairy herds. *Res Vet Sci* [Internet]. 2015;100:21–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.02.011>
69. Fulton RW, d’Offay JM, Landis C, Miles DG, Smith RA, Saliki JT, et al. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea virus type 1 and type 2 in non-vaccinated cattle herds in the Pacific Region of Central Costa Rica. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* [Internet]. 1995;11(3):521–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.12.004>
70. Casarin E, Lucchese L, Grazioli S, Facchin S, Realdon N, Brocchi E, et al. A New ELISA Using the ANANAS Technology Showing High Sensitivity to diagnose the Bovine Rhinotracheitis from Individual Sera to Pooled Milk. Gopinath SCB, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jan 13 [cited 2018 Aug 14];11(1):e0145912. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0145912>
71. Tignon M, De Baere M, Hanon JB, Goolaerts A, Houtain JY, Delooz L, et al. Characterization of three commercial ELISA kits for detection of BOHV-1 gE specific antibodies in serum and milk samples and applicability of bulk milk for determination of herd status. *J Virol Methods* [Internet]. 2017;245(August 2016):66–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.03.015>
72. Nylin B, Strøger U, Rønsholt L. A retrospective evaluation of a Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) antibody ELISA on bulk-tank milk samples for

classification of the BHV-1 status of Danish dairy herds. *Prev Vet Med*. 2000;47(1–2):91–105.

73. Raaperi K, Orro T, Viltrop A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. *Vet J* [Internet]. 2014;201(3):249–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.040>
74. OIE World Organization for Animal Health. Bovine Virus Diarrhoea Virus. Available from: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.04.07\\_BVD.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.07_BVD.pdf)
75. Klintevall K, Näslund K, Svedlund G, Hajdu L, Linde N, Klingeborn B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *J Virol Methods*. 1991;33(3):319–33.
76. Mammerickx M, Portetelle D, Nys J, Burny A, Larson R, Grotelueschen D, et al. Evaluation of an iscom ELISA used for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Prev Vet Med* [Internet]. 2003;110(1):601–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.06.004>
77. Björkman C, Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol*. 1999;29(10):1497–507.
78. Solis-Calderon JJ, Segura-Correa VM, Segura-Correa JC, Alvarado-Islas A. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Prev Vet Med*. 2003;57(4):199–208.
79. Cowley DB, Clegg TA, Doherty ML, More SJ. Aspects of bovine herpesvirus-1 infection in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. *Acta Vet Scand*. 2011;53(1):1–9.
80. Segura-Correa JC, Solorio-Rivera JL, Sánchez-Gil LG. Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herds of Michoacan, Mexico. *Trop Anim Health Prod*. 2010;42(2):233–8.

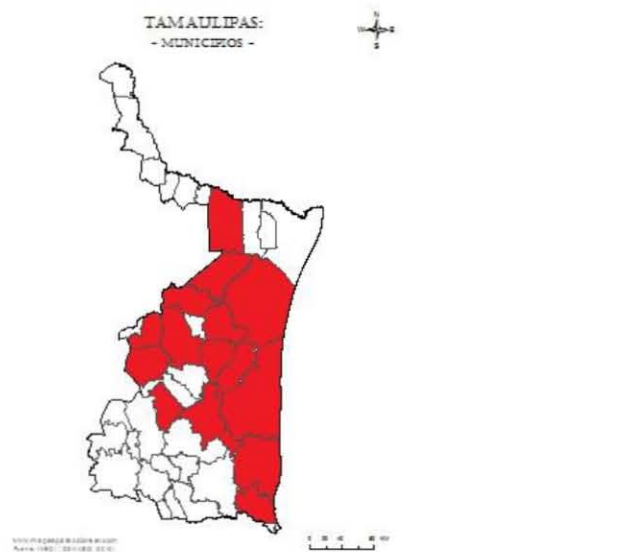
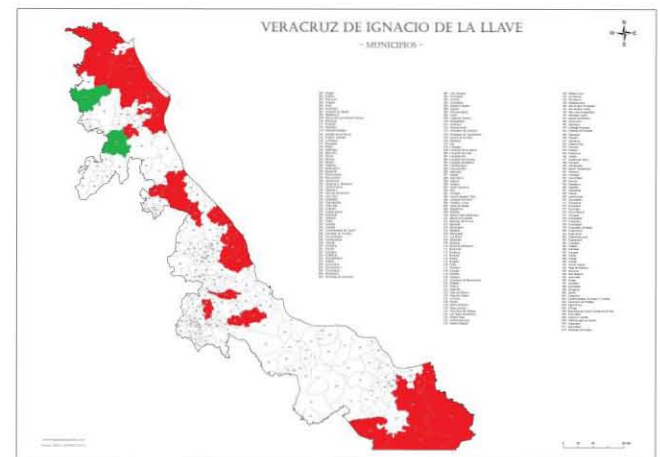
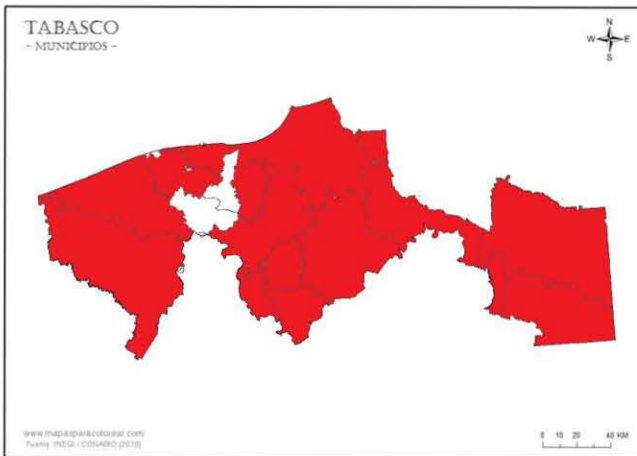
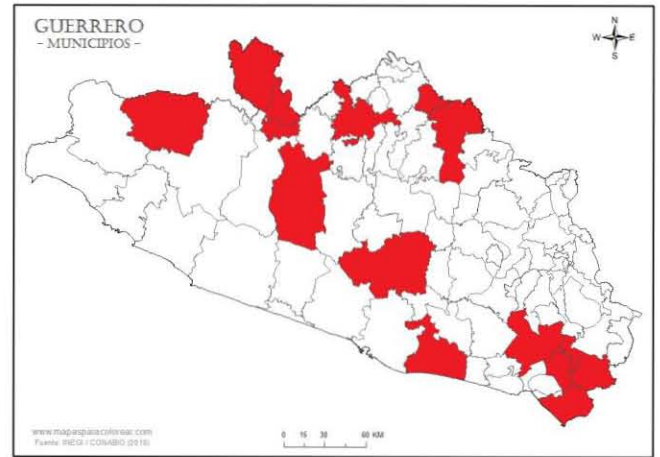
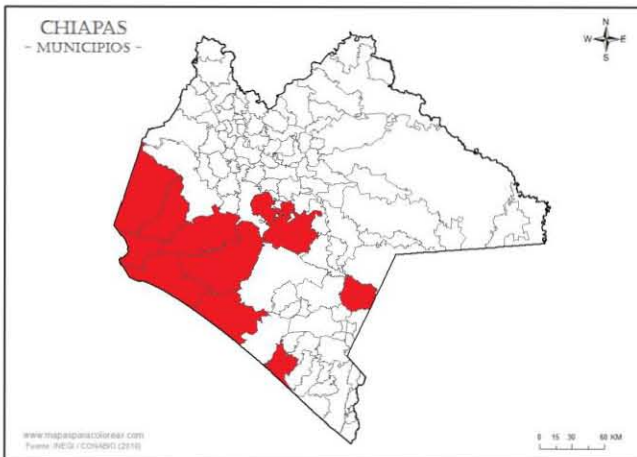
81. Graham DA, Clegg TA, Thulke HH, O'Sullivan P, McGrath G, More SJ. Quantifying the risk of spread of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) between contiguous herds in Ireland. *Prev Vet Med.* 2016;126:30–8.
82. Acaite J, Tamosiunas V, Lukauskas K, Milius J, Pieskus J. The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev Vet Med.* 2007;82(1–2):83–9.
83. Nekouei O, VanLeeuwen J, Sanchez J, Kelton D, Tiwari A, Keefe G. Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Prev Vet Med [Internet].* 2015;119(3–4):105–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.025>
84. Kobayashi S, Hidano A, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Nishida T, et al. Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan: A nationwide survey. *Res Vet Sci [Internet].* 2014;96(1):47–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.014>
85. García-Vázquez Z, Cruz-Vázquez C, Medina-Espinoza L, García-Tapia D, Chavarria-Martinez B. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Vet Parasitol.* 2002;106(2):115–20.
86. Fávero JF, Da Silva AS, Campigotto G, Machado G, Daniel de Barros L, Garcia JL, et al. Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. *Microb Pathog.* 2017;110:202–7.
87. Raizman EA, Pogranichniy R, Negron M, Schnur M, Tobar-Lopez DE. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea virus type 1 and type 2 in non-vaccinated cattle herds in the Pacific Region of Central Costa Rica. *Trop Anim Health Prod.* 2011;43(4):773–8.
88. Waldner CL. Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhoea virus,



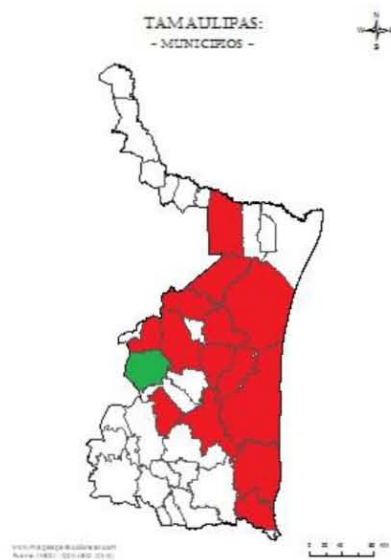
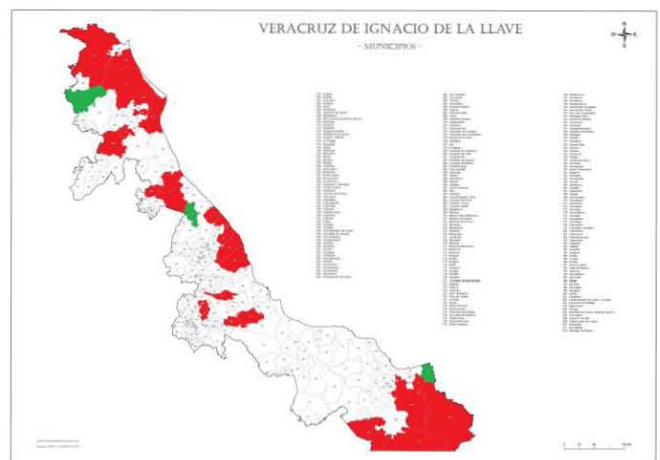
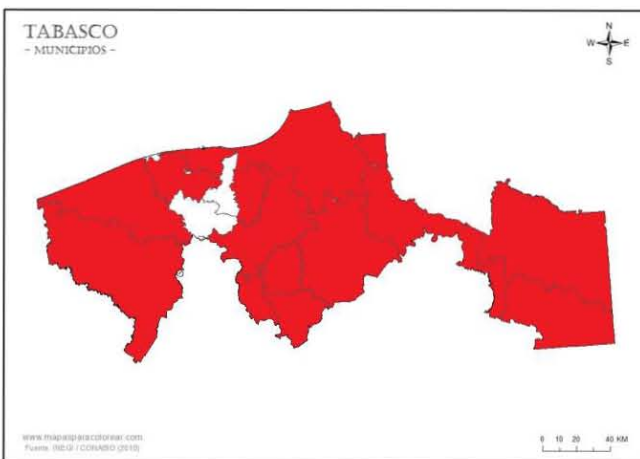
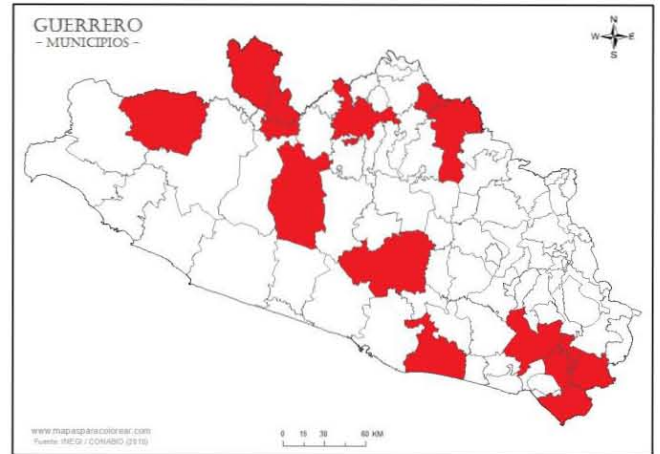
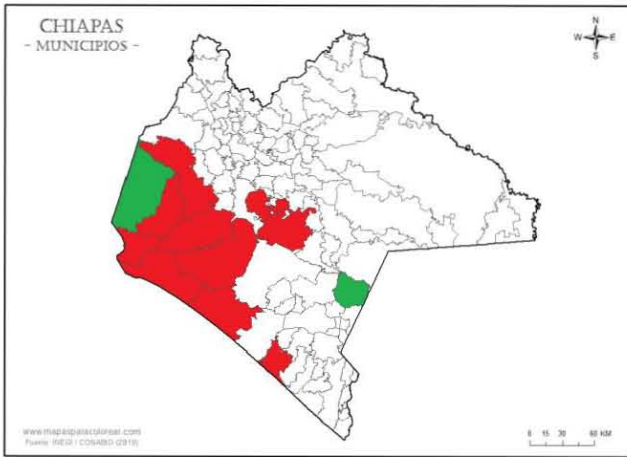
and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. *Anim Reprod Sci.* 2005;90(3–4):219–42.

89. Risalde MA, Molina V, Sánchez-cordón PJ, Pedrera M, Romero-palomo F, Bautista MJ, et al. María A. Risalde, DVM, PhD; Verónica Molina, BMSc; Pedro J. Sánchez-Cordón, DVM, PhD; Miriam Pedrera, DVM, PhD; Fernando Romero-Palomo, DVM; María J. Bautista, DVM, PhD; Alberto Moreno, BMSc, PhD; José C. Gómez-Villamandos, DVM, PhD. 2013;74(4).
90. Guarino H, Núñez A, Repiso M V., Gil A, Dargatz DA. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med.* 2008;85(1–2):34–40.
91. Neverauskas CE, Nasir A, Reichel MP. Prevalence and distribution of *Neospora caninum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle in the Northern Territory of Australia. *Parasitol Int* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2018 Aug 20];64(5):392–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576915000781>
92. Mammerickx M, Portetelle D, Nys J, Burny A. Rapid Detection of Bovine Leukaemia Virus Infection in a large Cattle Population with an ELISA performed on Pooled Sera Grouped by Herd. *Zentralblatt für Veterinärmedizin R B.* 1985;32(1–10):601–8.

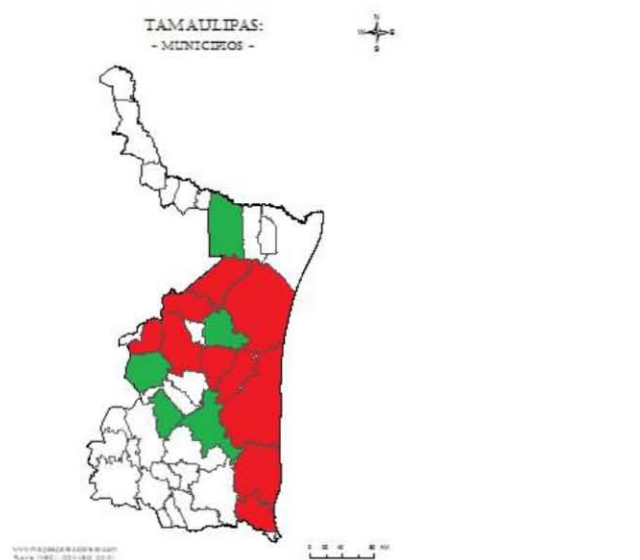
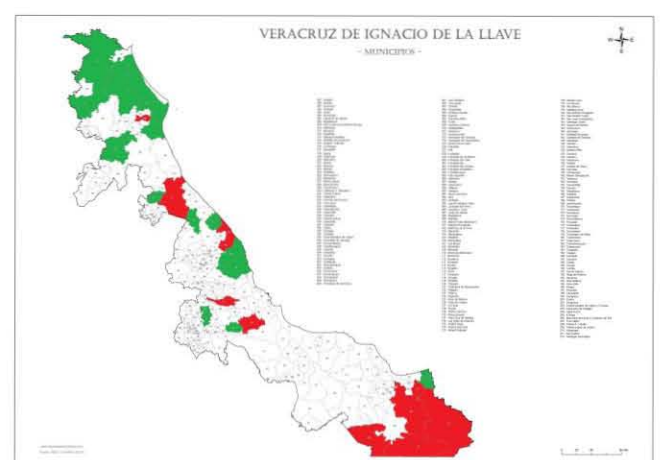
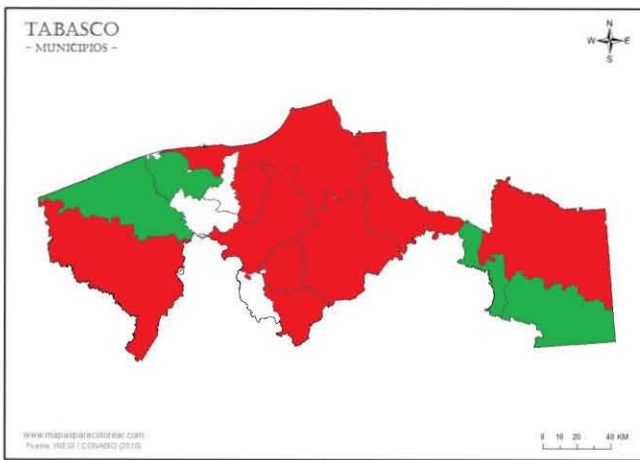
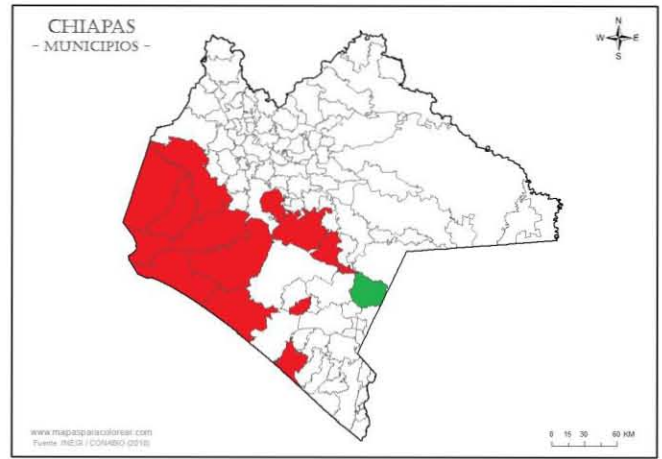
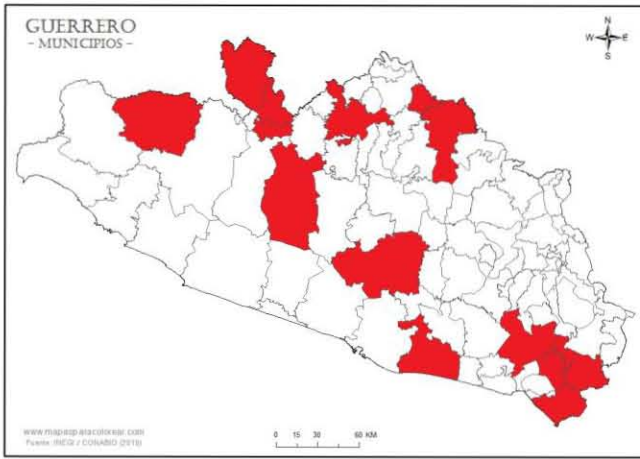
## ANEXOS



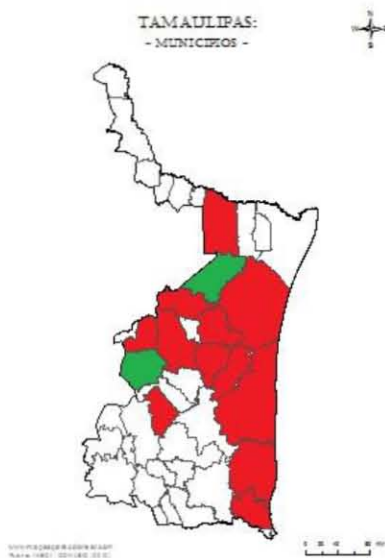
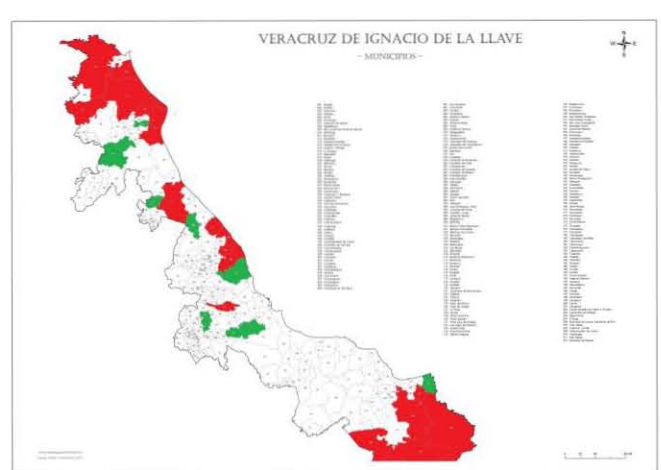
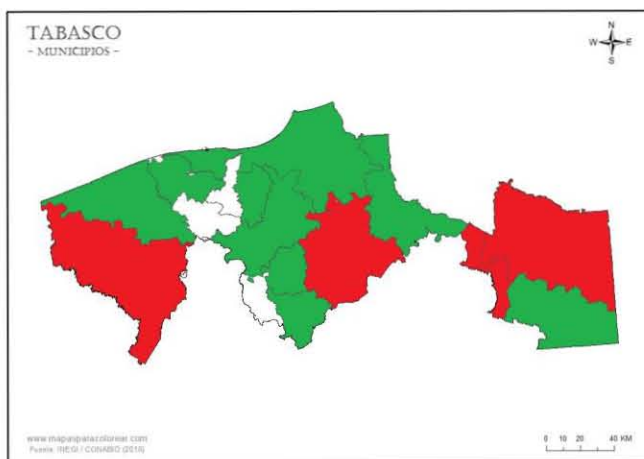
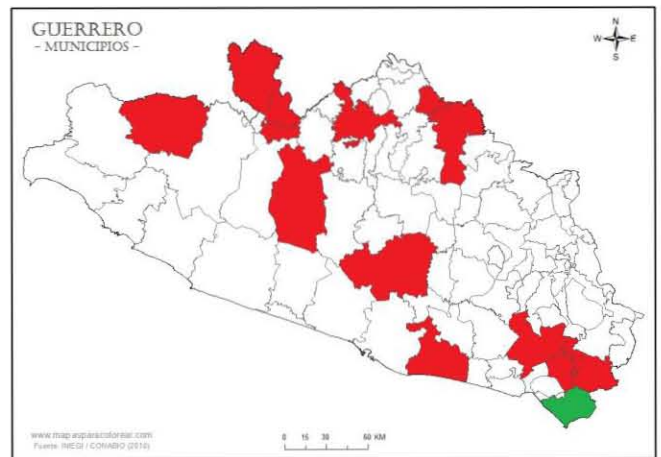
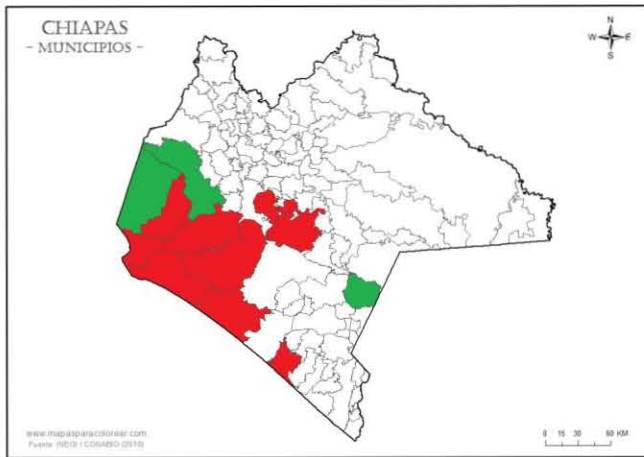
Mapas de DVB de los 5 estados evaluados, los municipios de color rojo son positivos a la enfermedad y los de color verde negativos.



Mapas de IBR de los 5 estados evaluados, los municipios de color rojo son positivos a la enfermedad y los de color verde negativos.



Mapas de LEB de los 5 estados evaluados, los municipios de color rojo son positivos a la enfermedad y los de color verde negativos.



Mapas de NC de los 5 estados evaluados, los municipios de color rojo son positivos a la enfermedad y los de color verde negativos.