



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DIAGNÓSTICO DE SITUACIÓN DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES QUE
AFECTAN A LOS OVINOS EN DIFERENTES UNIDADES DE PRODUCCIÓN
OVINA EN ALGUNAS COMUNIDADES DEL ESTADO DE MÉXICO.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

DIANA LIZETH GUTIÉRREZ TREJO

ASESOR: DR. JOSE FRANCISCO MORALES ALVAREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2022



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis.**

DIAGNÓSTICO DE SITUACIÓN DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES QUE AFECTAN A LOS OVINOS EN DIFERENTES UNIDADES DE PRODUCCIÓN OVINA EN ALGUNAS COMUNIDADES DEL ESTADO DE MÉXICO.

Que presenta la pasante: **Diana Lizeth Gutiérrez Trejo**
Con número de cuenta: **416064728** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Abril 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz	
VOCAL	Dr. José Francisco Morales Álvarez	
SECRETARIO	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
1er. SUPLENTE	Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Eréndira de la Fuente Mancera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia; mis padres Alfonso y Flora, gracias por apoyarme en cada paso que doy, por siempre confiar en mí a pesar de la distancia, por sus enseñanzas y valores que me han permitido llegar a donde estoy ahora, los quiero muchísimo y les dedico este logro. A mi hermana Nayeli, de mis mejores amigas, un ejemplo a seguir y una inspiración para mí, muchas gracias por apoyarme, quererme y creer en mí.

A mi tía Lucy, Lorena y Ricardo, por recibirme en su casa, apoyarme al llegar a esta aventura, por su compañía y enseñanzas.

Agradezco a cada uno de los profesores de mi carrera, que contribuyeron a mi formación y me enseñaron la belleza de la carrera, al Dr. Juan Carlos del Río, por ser el primero en enseñarme la fascinante materia de Patología, al M en MVZ Víctor Sánchez, gracias por su apoyo, llevarme a los ranchos, tomar las muestras de los borregos y sus enseñanzas.

Al laboratorio de diagnóstico, INIFAP, a Sara por su apoyo y siempre resolver mis dudas, a Fer, Moni, Alex y Nancy por su compañerismo y buenos momentos juntos, e infinitas gracias al Dr. Francisco Morales, una gran persona, maestro y amigo, gracias por sus enseñanzas, su amor a la patología y como asesor de mi proyecto.

Agradezco a mis sinodales, por su apoyo, su tiempo y sus valiosas correcciones a este trabajo.

Agradezco a todos los amigos que hice durante la carrera, pues cada uno de ellos me apoyo y motivo a seguir adelante de una u otra manera. Especialmente a Citlali, Refugio y Edgar, muchas gracias por todos los buenos momentos.

A Julio Verdín, por ser un gran apoyo, ayudarme a crecer profesional y personalmente, creer en mí siempre y estar conmigo en cada uno de los pasos de este proceso, muchas gracias.

A Darcy, la mejor y más hermosa compañía, llegaste en el momento que más te necesitaba y agradeceré siempre poder tenerte en mi vida.

Gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Brucelosis	4
2.2 Linfadenitis caseosa	7
2.3 Histofilosis.....	10
2.4 Clamidiasis.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVO GENERAL	16
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
7. MATERIAL Y MÉTODOS	17
7.1 Obtención de muestras.....	17
7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	19
7.3 Inmunodifusión en gel de agar (IDGA).....	23
7.4 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	23
7.5 Técnicas de aglutinación (tarjeta):	24
7.6 Aislamiento bacteriano.....	24
7.7 Coproparasitoscópicos (flotación).....	24
7.8 Sedimentación	25
8. RESULTADOS	26
9. DISCUSIÓN	33
10. CONCLUSIONES	39
11. REFERENCIAS	40
12. ANEXOS	46
Anexo 1. Método de extracción por estuche comercial.....	46
Anexo 2. Método de extracción por fenol-agua	47
Anexo 3. Método de sonicación.....	48
Anexo 4. Preparación de el gel de agarosa para IDGA	49

RESUMEN

Diagnóstico de situación de las principales enfermedades que afectan a los ovinos en diferentes unidades de producción ovina en algunas comunidades del Estado de México. *

Las enfermedades infecciosas pueden ser consideradas como un problema que frena la producción de pequeños rumiantes, causando pérdidas económicas importantes en casi todo el mundo. Dentro de las enfermedades de mayor impacto entran las enfermedades reproductivas, como la brucelosis, histofilosis, clamidiasis, entre otras, además de otras enfermedades no reproductivas como la linfadenitis caseosa. Por lo que es de gran importancia realizar un diagnóstico preciso para establecer de forma correcta las medidas de prevención y control de las mismas. La mayoría de las técnicas diagnósticas que identifican de manera definitiva el agente causal no están disponibles o solo se llevan a cabo en laboratorios especializados. En este estudio, se identificaron las principales enfermedades infecciosas que afectan a los ovinos en las unidades de producción en algunas comunidades del Estado de México y el Estado de Hidalgo. En un periodo de aproximadamente cuatro meses, se visitaron recurrentemente unidades de producción en el Estado de México y el Estado de Hidalgo, se tomaron muestras de animales con signos clínicos, así como, de animales aparentemente sanos de los que se sospechaba de alguna enfermedad. Estas muestras se llevaron al Laboratorio Diagnóstico del CENID Salud Animal e Inocuidad, sede Palo Alto, INIFAP. Se colectaron un total de 296 de muestras para las cuales se realizaron pruebas según el diagnóstico clínico, se utilizaron pruebas de reacción de cadena de la polimerasa (PCR), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunodifusión en gel de agar (IDGA), prueba de tarjeta, aislamiento bacteriano, sedimentación y flotación. Respecto a las enfermedades reproductivas se encontraron prevalencias de 16.5% a brucelosis

* Este trabajo de tesis fue financiado por el proyecto: “Estandarización y elaboración de un paquete tecnológico sobre técnicas de diagnóstico de las principales enfermedades de los pequeños rumiantes”. No. De SIGI: 1434034757

relacionada a la infección por brucelas lisas, así como un 10% a brucelosis por brucelas rugosas, 5.3% de prevalencia a histofilosis y 24% a clamidiasis, todas las anteriores causando problemas de epididimitis. De estos animales, hubo 6 que resultaron positivos a más de un agente infeccioso, haciendo evidente la coinfección por diversos agentes. Con la linfadenitis caseosa, se tuvo una prevalencia de 4 a 4.6% en las unidades de producción visitadas; de las muestras obtenidas también se observaron 5 animales positivos a *Staphylococcus* spp., ambas infecciones en animales con cuadro clínico de abscesos en mandíbula y cuello. También se encontró la presencia de nematodos gastrointestinales en 5 muestras de las 21 que se evaluaron en una sola unidad de producción (23.8%). En general, de la mayoría de las enfermedades ya había registros previos, sin embargo, se evidenció la falta de información de los productores sobre las mismas, por lo que se considera relevante la difusión de información sobre las principales enfermedades que afectan a ovinos, así como su prevención y control, y con ello mejorar la salud animal y evitar las pérdidas económicas que afectan a la producción ovina de la región y del país.

2. INTRODUCCIÓN

La producción de pequeños rumiantes se consolida cada vez más en el país y crece con grandes avances que benefician al mismo. Las enfermedades infecciosas están consideradas como uno de los problemas que frenan la producción de pequeños rumiantes, siendo la brucelosis, linfadenitis caseosa, histofilosis, clamidiasis, entre otras, las de mayor impacto en las unidades de producción (Guzmán *et al.*, 2016).

Las enfermedades infecciosas producen grandes pérdidas económicas a los productores de rumiantes en casi todo el mundo, no solo por la muerte de los animales, sino también por disminución en ganancias de peso, menor eficiencia en la conversión alimenticia y costos elevados del tratamiento en animales afectados con procesos crónicos, entre otros (Álvarez *et al.*, 2016).

Las enfermedades que pueden afectar a los animales son numerosas, por lo que se debe hacer un análisis profundo y minucioso de los factores de riesgo que pueden determinar su presentación. Con el propósito de implementar medidas de control y profilaxis, lo más importante es realizar un diagnóstico definitivo o etiológico. Un mal diagnóstico nos lleva a establecer medidas de control y profilaxis equivocadas y con ello elevar las pérdidas económicas (Peña *et al.*, 2018).

El diagnóstico de la enfermedad se inicia basado en los signos clínicos y lesiones, aunque en ciertos casos solo se logra el aislamiento de algunos agentes bacterianos, ya que éste es relativamente sencillo. El análisis anatómico-patológico que se obtiene al hacer la necropsia, es una herramienta para lograr un diagnóstico confiable de las enfermedades y si bien, la patología difícilmente da la etiología del proceso de manera directa, es importante para direccionar el diagnóstico, permitiendo descartar la participación de algunos agentes y reafirmar la participación de otros (Peña *et al.*, 2018).

La mayoría de las técnicas diagnósticas que identifican de manera definitiva el agente causal no están disponibles o solo se llevan a cabo en laboratorios especializados, principalmente por su alto costo. No obstante, es más costoso realizar medidas de control y profilaxis sin haber determinado al agente etiológico

implicado en el proceso, es por lo que las medidas para prevenir y controlar la enfermedad en las unidades de producción no son un gasto, sino una inversión (Álvarez *et al.*, 2015).

Por otra parte, existen enfermedades infecciosas causadas por distintos serotipos o serovariedades de un mismo agente, entre los cuales no hay una antigenicidad cruzada que permita una vacunación efectiva, lo que hace indispensable conocer qué serotipos están presentes infectando animales en la unidad de producción para protegerlos contra la variedad de patógenos específica (Álvarez *et al.*, 2016).

Existe una gran diversidad de pruebas que permitirían establecer un diagnóstico etiológico. Estas pruebas no se utilizan de manera rutinaria a pesar de ser muy sensibles y específicas. Ejemplo de estas técnicas lo constituyen la reacción en PCR, la inmunohistoquímica (IHQ) y la inmunofluorescencia (IF); pruebas que son muy útiles en el diagnóstico al detectar la presencia de algún componente estructural del agente infeccioso en muestras clínicas y tejidos, así como para la detección de bacterias de difícil aislamiento y sobre todo para agentes virales (Álvarez *et al.*, 2015).

Actualmente, en México se cuenta con información referente a la incidencia y prevalencia de la mayoría de los agentes etiológicos que afectan a los diferentes sistemas en el ganado, pero, estos estudios han sido de manera aislada y en muy pocos casos se analizan de manera integral.

Para poder establecer una estrategia correcta de diagnóstico es importante conocer las características de las enfermedades más comunes y de más alto impacto que se presentan en las unidades de producción. Algunas de estas enfermedades que destacan por su importancia son las de tipo reproductivo y de las que ya se tienen antecedentes en las unidades de producción ovina de la región, por lo que, a manera de ejemplo se hará una breve reseña de las mismas.

2.1 Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por el género *Brucella*, que afecta al humano, así como a diferentes especies de mamíferos

domésticos y silvestres. Se considera enzoótica en México y la zoonosis bacteriana más importante (Peña *et al.*, 2018).

El ovino es susceptible de ser infectado por dos especies, *B. melitensis* y *B. ovis*; la infección por *B. melitensis* es común en aquellos lugares donde la cría de ovinos se desarrolla en estrecho contacto con la de caprinos. *B. ovis* es el agente causal de la “epididimitis del carnero”; ésta es una enfermedad infectocontagiosa, clínica o subclínica, de curso crónico que afecta en condiciones naturales al ovino (Trezeguet *et al.*, 2015; Xavier *et al.*, 2010).

La infección por *Brucella* es de distribución mundial y se encuentra en todos los países donde la producción ovina es importante, causando serios perjuicios económicos (López, 2007).

- **Etiología:** en ovejas y cabras la causa principal de la brucelosis es *B. melitensis*, un cocobacilo o bacilo corto Gram negativo inmóvil, que no forma esporas o flagelos. Es un patógeno intracelular facultativo que posee tres serovariedades. También puede ser causada por *B. ovis* en caso de los ovinos machos. Ocasionalmente se producen infecciones por *B. abortus* y *B. suis*, pero la enfermedad clínica parece ser poco frecuente (IICAB, 2009; Coelho *et al.*, 2014).

La *Brucella* en medios de cultivo se observan como colonias redondas de 1 a 2 mm de diámetro con márgenes lisos, translúcidas de color amarillo pálido o convexas de color perla. Posteriormente se vuelven mayores y ligeramente más oscuras. El pH óptimo de crecimiento varía de 6.6 a 7.4, la temperatura ideal es de entre 36°C a 38°C, aunque la mayoría de las cepas pueden crecer en un rango de los 20 a 40°C (Coelho *et al.*, 2014).

- **Patogénesis:** la vía de entrada de *B. melitensis* suele ser por medio de las mucosas (más comúnmente la mucosa oral), de donde las bacterias son transportadas a los linfonodos más próximos, donde ocurre la multiplicación. La especial afinidad que *B. melitensis* tiene por el endometrio gestante y por la placenta fetal provoca la principal manifestación clínica de la infección: el aborto durante el último tercio de la gestación o el nacimiento de animales prematuros con poca

viabilidad. Los animales generalmente abortan una vez, aunque se sigue eliminando la bacteria en cada gestación subsecuente en el periparto (Manazza *et al.*, 2006; López, 2007).

La brucelosis por *B. ovis* es una enfermedad venérea, la transmisión es a través del semen, siendo la vía más importante la monta natural. En los carneros penetra en los tejidos y es transportada por linfa, ya sea libre o en el interior de las células fagocíticas, hasta alcanzar los linfonodos regionales y se difunden vía hematogena a todo el organismo principalmente tracto genital, hígado, bazo, pulmones, riñones y linfonodos (López, 2007).

En las hembras que entran en contacto con *B. ovis* se observa una cervicovaginitis mucopurulenta transitoria, salpingitis y endometritis que pueden originar reabsorción fetal o esterilidad (Coelho *et al.*, 2014).

- **Signos clínicos y lesiones:** los signos en las ovejas infectadas son aborto, muerte fetal y nacimiento de crías débiles. Por lo general el aborto ocurre durante el último tercio de gestación y se produce solo una vez, pero en gestaciones posteriores hay una nueva invasión del útero con excreción de la bacteria. Se puede producir epididimitis y orquitis aguda en los machos, lo que provoca infertilidad y conduce generalmente a la infección crónica, ocasionalmente se observa artritis (SAG, 2016).

Las lesiones que se observan con mayor frecuencia son metritis purulenta con exudado hemorrágico en las carúnculas y endometrio, también se puede presentar placentitis necrótica, cambios testiculares palpables, orquitis y epididimitis necrosante (López, 2007).

La infección por *B. ovis* se manifiesta con abortos en el último tercio de gestación y reabsorción embrionaria con repetición de celo. En machos la epididimitis está mayoritariamente en la cola del epidídimo que presenta un aumento de tamaño tres o cuatro veces superior al normal y consistencia dura, involucrando un solo epidídimo, también pueden ocurrir anomalías testiculares caracterizadas por atrofia y pérdida de tono (López, 2007).

- **Diagnóstico:** las pruebas serológicas empleadas con mayor frecuencia en los pequeños rumiantes son las de aglutinación o de rosa de bengala en placa y en tarjeta al 3%, y la prueba de fijación de complemento. También se emplean los ensayos indirectos como ELISA. En los ovinos y caprinos vacunados se pueden utilizar pruebas de precipitación basadas en haptenos nativos. La prueba de fijación del complemento, la prueba de IDGA y la prueba de ELISA se llevan a cabo usando antígenos de superficie solubles obtenidos de la cepa *B. ovis* (Padilla *et al.*, 2003).

El diagnóstico más preciso es el aislamiento de la bacteria, a pesar de que, este género es difícil de aislar, y su crecimiento suele ser lento. La prueba de PCR se vuelve importante para el diagnóstico rápido y eficiente (Álvarez *et al.*, 2015).

- **Prevención y control:** la vacuna utiliza una cepa viva como inmunógeno, la vacuna Rev 1 de *B. melitensis* se aplica por vía subcutánea o conjuntival, en dosis clásica en hembras de tres a cuatro meses de edad y en dosis reducida en hembras mayores de seis meses. No se recomienda usar la cepa RB51 en ovinos y caprinos (Coelho *et al.*, 2014).

2.2 Linfadenitis caseosa

La linfadenitis caseosa o pseudotuberculosis es una enfermedad bacteriana crónico-contagiosa de los pequeños rumiantes. Se caracteriza por la formación de abscesos en linfonodos, piel y diversos órganos internos (Barrientos *et al.*, 2008).

Se conoce que la linfadenitis caseosa a nivel mundial ocasiona pérdidas por desecho de animales, disminución de la producción láctea, desordenes reproductivos, decomiso y en raros casos, mortalidad (Barrientos *et al.*, 2008; Lloyd, 2000).

- **Etiología:** el agente causal de la linfadenitis caseosa es *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Son bacterias Gram positivas, intracelulares facultativas, son bastones pleomórficos de 0.5 µm a 0.6 µm de ancho por 1.0 µm a 3.0 µm de largo, anaerobia facultativa, no esporulada, sin cápsula y no móvil. Sus colonias son pequeñas, blancas y secas, su crecimiento en medios de cultivo tarda

aproximadamente 48 horas a 37°C. Los medios más utilizados son el medio PPLO y el BHI (Lloyd, 2000).

La exotoxina fosfolipasa D es su principal factor de virulencia, inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y la degranulación de células fagocíticas, y activa complemento por la vía alternativa, ocasionando necrosis y trombosis en los linfonodos y favoreciendo la supervivencia y multiplicación del microorganismo. Otro factor de virulencia, son los lípidos de pared celular que protegen a la bacteria de la fagocitosis e induce necrosis hemorrágica y abscedación crónica (Hernández, 2015).

- **Patogenia:** la transmisión de la infección es a través de heridas. Existen dos presentaciones de la enfermedad: la cutánea o superficial, que se caracteriza por afectar a los linfonodos superficiales o el tejido subcutáneo, la segunda es la visceral o generalizada que afecta los linfonodos y órganos internos, como el hígado, riñones o glándula mamaria, ocasionalmente el corazón, cerebro, médula espinal, testículos y articulaciones (Hernández, 2015; Belchior *et al.*, 2007).

La infección puede iniciar con la presencia de un animal infectado, que libera a la bacteria través de una herida, donde se disemina a los linfonodos y diversos órganos viscerales, hay un crecimiento bacteriano incontrolado dentro de los macrófagos, por lo que el hospedador intenta restringir y limitar la infección a través de la formación de piogranulomas que encapsulan las células infectadas con *C. pseudotuberculosis* en el linfonodo afectado que supura y disemina a otros linfonodos externos o internos. Posteriormente se inicia el proceso en el que disminuye la reacción inflamatoria en el parénquima del linfonodo que se encapsula de manera lenta aumentando de tamaño y con mayor consistencia sólida, también ocurre la formación de pequeños nódulos de mineralización que se distribuyen como capas concéntricas que al corte dan apariencia de "anillo de cebolla". El periodo de incubación es muy largo, pudiendo durar de dos a seis meses (Hernández, 2015; Belchior *et al.*, 2007).

- **Signos clínicos y lesiones:** en la presentación cutánea el principal signo clínico es la presencia de abultamientos en la piel. Estos abultamientos pueden

presentarse de manera solitaria o en cadenas, afectando principalmente los linfonodos de cabeza y cuello. En la presentación visceral los signos clínicos varían según el órgano al que se haya diseminado. Si alcanza el sistema nervioso central, los signos serán nerviosos, si alcanza la glándula mamaria se manifestará como mastitis purulenta. La presentación visceral es más común en ovinos, afectando principalmente al pulmón (Carrillo *et al.*, 2005; Hernández, 2015).

Las lesiones en ambos casos son abscesos que se forman en los linfonodos afectados, que suelen ser de 1 a 2 cm de diámetro con pérdida de pelo en la zona, contienen material color verde pálido que puede formar de manera progresiva la estructura concéntrica de “anillos de cebolla” que a su vez madura a una masa calcificada (Hernández, 2015).

- **Diagnóstico:** habitualmente el diagnóstico se hace con base a los signos clínicos, que son muy característicos de la enfermedad, especialmente cuando ésta es crónica y se forman las lesiones en forma de “anillos de cebolla”. Sin embargo, también existen diferentes métodos empleados para diagnosticar la enfermedad. El diagnóstico definitivo es el microbiológico, se realiza cultivando el material purulento colectado en agar sangre al 5% o agar de telurito de potasio incubándolo en una estufa bacteriológica en anaerobiosis a 37° C por 48 a 72 horas. Para el diagnóstico molecular se ha desarrollado la técnica de PCR gracias a el uso de iniciadores específicos para cada especie, se puede determinar con precisión la presencia de *C. pseudotuberculosis* (Belchior *et al.*, 2007; Carillo *et al.*, 2005).

- **Prevención y tratamiento:** la bacteria es sensible a la mayoría de los antibióticos. Otro tratamiento convencional que se utiliza es el drenado del absceso, aunque la probabilidad de reincidencia es muy alta, el procedimiento consiste en debridar el absceso en un lugar aislado, realizando un lavado de la zona afectada con solución antiséptica y aplicación de un antibiótico parenteral (Hernández, 2015).

Existen vacunas comerciales que no están disponibles en México, por lo que se han desarrollado inmunógenos basado en diferentes antígenos como toxoides o bacterias completas inactivadas. También se han creado vacunas y toxoides

inactivados con formalina que han demostrado dar buenos resultados (Carillo *et al.*, 2005).

2.3 Histofilosis

Histophilus somni puede causar una variedad de afectaciones en los ovinos, que incluyen cuadros respiratorios, nerviosos, septicémicos, reproductivos y articulares (Casademunt, 2008).

- **Etiología:** *H. somni* es un cocobacilo pleomórfico, Gram-negativo, anaerobio facultativo, previamente conocido como *H. ovis*, *Haemophilus agni* o *Haemophilus somnus*, y es un habitante normal del tracto respiratorio y urogenital del bovino, ovino y caprino. Es una bacteria de crecimiento lento (de 48 a 72 horas) y se incuba con CO₂ al 10%. Sus colonias son pequeñas y de color amarillo, y por el crecimiento lento sus colonias, éstas pueden enmascarse por otras de crecimiento más rápido (Sandal e Inzana, 2010).

H. somni fue descrito por primera vez en muestras de semen de borregos con epididimitis en México en 2005 utilizando la técnica de PCR (Aguilar *et al.*, 2008).

- **Patogenia:** la infección en ovinos tiende a ser endémica ya que la bacteria se mantiene como comensal en el tracto genital de las ovejas y carneros jóvenes, y se transmite por vía reproductiva o aérea (Aguilar *et al.*, 2008).

No está muy clara la patogenia de *H. somni*, sin embargo, se sabe que la bacteria es capaz de resistir la acción de los neutrófilos, macrófagos y monocitos, los cuales fagocitan el microorganismo, pero no pueden eliminarlo, motivo por el cual éste persiste y prolifera contribuyendo al desarrollo de la enfermedad (Gutiérrez, 2017).

- **Signos clínicos y lesiones:** en ovinos puede llegar a causar problemas reproductivos como epididimitis, orquitis, vulvitis, mastitis, reducción de fertilidad y llegar a una septicemia, causar una infección subclínica, sin lesiones escrotales palpables, esta infección puede ser la fase inicial de los problemas reproductivos que se vuelven clínicamente visibles o de una infección primaria que puede persistir por años (Casademunt, 2008).

Datos experimentales revelan que *H. somni* tiene la capacidad de causar muertes en embriones. También se ha aislado frecuentemente de útero y de casos de endometritis. Esto puede causar infertilidad y aumento en número de dosis de semen por concepción (Romero *et al.*, 2013). En tracto respiratorio alto puede causar laringitis y traqueítis. En el tracto respiratorio bajo puede causar neumonía, cursando con hipertermia, salivación, lagrimeo, postración e incremento de la frecuencia respiratoria. En bovinos se reconoce que causa meningoencefalitis tromboembólica (Romero *et al.*, 2013).

Las lesiones encontradas suelen ser pleuritis fibrinosa y pleuroneumonía con presencia de fibrina en las superficies pleurales de los lóbulos afectados. Además de la forma respiratoria, nerviosa y reproductiva hay otras presentaciones menos reportadas clínicas y subclínicas como mastitis, poliartritis, conjuntivitis y otitis (Aguilar *et al.*, 2005).

- **Diagnóstico:** para confirmar la presencia de *H. somni* se utilizan las técnicas de IDGA, ELISA, inmunohistoquímica y PCR a partir de semen de carneros con epididimitis (Romero *et al.*, 2013; Gutiérrez, 2017).

- **Control y prevención:** se recomienda la revisión de carneros previo a la época de servicio y eliminar aquellos con problemas de epididimitis u orquitis que puedan diseminar el patógeno a otros animales (Gutiérrez, 2017).

2.4 Clamidiasis

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR) o clamidiasis es causado por la bacteria *Chlamydia*. El AEPR ocurre al final de la gestación y provoca importantes pérdidas económicas, existe evidencia de su presencia en rebaños ovinos y caprinos en México (OIE, 2018; Mora *et al.*, 2015).

- **Etiología:** se entiende por clamidiasis a aquellos procesos infecciosos ocasionados por *Chlamydia* spp. Las clamidias son microorganismos procariontes, no móviles, intracelulares obligados y aerobios (OIE, 2018).

- **Patogenia:** los animales susceptibles a *C. abortus* se infectan ingiriendo o inhalando a la bacteria que se encuentra en descargas vaginales, membranas

placentales de cabras que hayan abortado, así como agua o alimento contaminado (Arrevillaga *et al.*, 2007).

Después de la ingestión, la bacteria se aloja en las tonsilas y epitelio intestinal causando una infección subclínica, cuando hay un cambio en el sistema inmunológico, el microorganismo se disemina a órganos como el hígado, bazo y pulmón donde la bacteria permanecerá latente (Arrevillaga *et al.*, 2007; Ríos, 2011).

Los cambios fisiológicos derivados de la gestación inducen una segunda colonización, el microorganismo llega a células endometriales, infectando toda la pared endometrial entre los días 40 y 50 de gestación. De los días 60 a 90 de gestación la bacteria infecta al feto a través de los placentomas, provocando el aborto en el último tercio de la gestación (Arrevillaga *et al.*, 2007).

C. pecorum es comúnmente asociada a problemas del tracto digestivo de los ruminantes, aunque también puede ocasionar problemas de fertilidad, conjuntivitis, artritis, mastitis e inflamación pulmonar en borregos, cabras y bovinos (Ríos, 2011).

- **Signos clínicos y lesiones:** los animales infectados no muestran enfermedad clínica antes del aborto, aunque pueden observarse cambios de conducta y en las secreciones vulvares en ovejas durante las 48 últimas horas de gestación. Si hay aborto, pueden observarse descargas vaginales de color amarillento café ligeramente sanguinolento a los 14 días del aborto, las cuales contienen grandes cantidades de la bacteria (OIE, 2018).

Al momento del parto, las membranas placentarias aparecen engrosadas y se encuentran generalmente cubiertas por un exudado purulento de coloración amarillenta, lo que le da aspecto de “cuero”. Los fetos pueden presentar edema en cavidad abdominal y hematomas en esa región, las membranas fetales pueden presentar necrosis y el hígado se puede observar congestionado con puntos grises de necrosis focal (Arrevillaga *et al.*, 2007).

- **Diagnóstico:** la detección de infecciones causadas por *Chlamydia* puede efectuarse mediante el aislamiento en medios biológicos a partir de muestras contenidas en descargas vaginales, sangre, heces o tejidos obtenidos a la

necropsia, así como por pruebas serológicas como fijación del complemento, ELISA e inmunofluorescencia y mediante técnicas de identificación como tinciones o PCR. Estos métodos varían ampliamente en su sensibilidad y especificidad (SAG, 2014; Mora *et al.*, 2015).

La tinción de *Chlamydia* por Stamp, Machiavello o Ziehl Neelsen es rápida y se puede hacer en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico, pero su interpretación puede ser complicada por la diferenciación de *Chlamydia* con *Brucella* y *Coxiella* (SAG, 2018).

La prueba más empleada para el diagnóstico serológico de *C. abortus* es la de fijación de complemento, por lo que no es muy sensible ni específica por lo que no es de las más recomendadas. La detección de anticuerpos mediante métodos serológicos como ELISA y la prueba de anticuerpos fluorescentes demuestran solo la presencia del agente y no permiten la identificación de las especies, serotipos o subtipos respectivos (Ríos, 2011).

- **Tratamiento y prevención:** animales infectados pueden ser tratados con quimioterapéuticos de la familia de las tetraciclinas y la eritromicina. En casos de aborto enzoótico o procesos de poliartritis se puede administrar oxitetraciclina intramuscular (20 mg/kg) en las hembras y en otros animales afectados pueden reducir la severidad de la afección (Ríos, 2011).

Existen dos vacunas comerciales para el control del aborto clamidial en pequeños rumiantes, una de ellas utiliza una cepa viva atenuada de *C. abortus* y el antígeno de la otra se basa en microorganismos atenuados en conjunto con un adyuvante, ninguna de estas vacunas está disponible en México (Arrevillaga *et al.*, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

Para realizar un buen control y una profilaxis efectiva en una unidad de producción se requiere de un buen diagnóstico; ya que éste da pautas para determinar cuáles son las enfermedades infecciosas de importancia en una unidad de producción, zona, estado o país, y con ello establecer las medidas de control y profilaxis que se requieren para las enfermedades que realmente están presentes y generan un impacto negativo en los animales. El uso de las herramientas de laboratorio también es fundamental para llegar a ese buen diagnóstico.

Tanto la linfadenitis caseosa, brucelosis e histofilosis, por mencionar algunas, son enfermedades que en nuestro país generan grandes pérdidas económicas. Es debido a esto que el diagnóstico etiológico de estas enfermedades que se realizará en el presente trabajo sentará las bases para el tratamiento, prevención y control adecuado de las mismas, así como evitar las pérdidas económicas que ocasionan la presencia de estas enfermedades.

4. HIPÓTESIS

Si en las unidades productivas estudiadas en el estado de México y zonas aledañas en el estado de Hidalgo, existen casos clínicos de enfermedades comunes de los ovinos como son: linfadenitis caseosa, brucelosis ovina, clamidiasis e histofilosis, es factible que con el uso de diferentes técnicas diagnósticas se pueda corroborar el agente infeccioso presente en las unidades de producción incluidas en el estudio así como evaluar su frecuencia para estimar el impacto de éstas en cada unidad de producción

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de las principales enfermedades que afectan a los ovinos a través de un diagnóstico de situación utilizando técnicas como PCR, pruebas serológicas y bacteriológicas.

5. 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener muestras clínicas de unidades de producción de animales con signos clínicos de alguna enfermedad para enviar al laboratorio y determinar el diagnóstico etiológico.
- Procesar todas las muestras en el laboratorio según el diagnóstico presuntivo.
- Aplicar las diversas técnicas de diagnóstico tales como PCR, ELISA, histopatología, etc.
- Determinar cuáles son las principales enfermedades infecciosas en el ganado ovino en las comunidades bajo estudio.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Obtención de muestras

En un lapso de 4 a 6 meses se tomaron muestras de animales que presentaron signos clínicos sugestivos de alguna enfermedad de etiología infecciosa o bien en aquellos casos donde no hubo signos clínicos, pero que se sospechó de la presencia de algún problema infeccioso. Se tomaron muestras a los animales según la cantidad de estos, si era una población grande, se tomaba un porcentaje, si eran pocos animales, se tomaba muestra de toda la población. Las muestras fueron enviadas al laboratorio y conservadas de acuerdo con el tipo de muestra y posteriormente fueron trasladadas al laboratorio hasta su estudio. Todas las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico del CENID Salud Animal e Inocuidad, sede Palo Alto, INIFAP de acuerdo con el tipo de enfermedad de la cual se sospechaba.

Las herramientas metodológicas de diagnóstico que fueron utilizadas para la identificación del agente infeccioso involucrado incluyeron la PCR, ELISA, técnicas de aglutinación, coproparasitoscópicas y aislamiento bacteriano.

Se visitaron personalmente cinco unidades de producción (UP), sin embargo, hubo 7 unidades de producción que a pesar de que no se visitaron de forma presencial y no se contó con la descripción del lugar, fueron incluidas en el estudio, ya que se hizo el trato (la comunicación) con los productores para el envío de muestras al laboratorio utilizando servicio de mensajería a petición del médico responsable de la unidad de producción.

UP1: unidad ubicada en Jiquipilco, Estado de México, tenía una población 120 animales machos y hembras al momento de realizar el estudio, los cuales estaban destinados a la engorda. Se hizo el diagnóstico clínico de brucelosis ovina causada por *B. ovis*, ya que se observaron animales machos con cuadros de epididimitis, por lo cual se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero de 60 animales al azar en la población. Se realizó la prueba de IDGA para *B. ovis* e *H. somni* como diferencial.

UP2: Ubicada en Jiquipilco, con un grupo de 100 animales machos destinados a la engorda a, los cuales se trajeron de otro Estado, se observaron 2 machos con cuadros de epididimitis, por lo que se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero de 49 animales al azar. Se realizó la prueba de IDGA y ELISA para *B. ovis* e *H. somni* como diferencial, además de la ELISA para *Chlamydia* spp.

UP3: unidad ubicada en Zapopan de Juárez, Hidalgo, con una población de aproximadamente 50 animales: 37 hembras (mayoría de estas gestantes), con diez corderos y el resto eran sementales. Se reportaron abortos, así como, nacimiento de crías débiles por lo que se tomaron muestras de sangre de todas las hembras y de los machos. También, se identificaron animales que presentaban abscesos submandibulares, por lo que se sospechó de linfadenitis caseosa y se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero, así como hisopados del contenido del absceso. A todos los sueros de las hembras y los machos se les hizo la prueba tamiz de tarjeta para la brucelosis ovina, así como, ELISA para *Chlamydia*. Adicionalmente se realizó la IDGA a los sueros de los machos para *B. ovis*. En el caso de los hisopados, se hizo aislamiento bacteriano y posterior tinción de Gram para observación en microscopio. Del aislamiento se hizo la extracción de ADN para la prueba de PCR multiplex de *C. pseudotuberculosis*. A los sueros de los animales sospechosos de linfadenitis caseosa se les realizó la prueba de ELISA.

UP4: unidad de producción con más de 150 animales, siendo 4 sementales, aproximadamente 50 corderos y el resto hembras (la mayoría gestantes). La UP tenía algunos animales con historial de aborto, por lo cual se les tomaron muestras de sangre para la obtención de suero a dichas hembras, al igual que aquellas que tenían abscesos sospechosos a linfadenitis caseosa, de los cuales, al momento de debridar el absceso se tomó muestra con hisopo. A los sueros de las hembras con abortos se les realizó la prueba de tarjeta para brucelosis junto con el ELISA para clamidiasis. A los hisopados se les realizó aislamiento bacteriano y extracción de ADN de las colonias encontradas para la prueba PCR multiplex de *C. pseudotuberculosis*. A los sueros de los animales con abscesos se les realizó de igual manera el ELISA para detectar anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis*.

UP5: unidad de producción ubicada en Pachuca, Hidalgo. Con una población total de aproximadamente 120 animales teniendo ovinos y caprinos juntos, siendo 111 hembras, dos sementales y el resto corderos y cabritos. La UP tenía historia de entre 50 y 53 abortos recientes, todos en el último tercio de gestación, retención placentaria y nacimiento de crías débiles. Los sementales eran importados de Texas, EUA, los cuales no contaban con ningún tipo de documentación, por lo que se sospecha de brucelosis. Se toman muestras de sangre para la obtención de suero de todas las hembras ovinos y caprinas, así como de algunos mortinatos recientes. A los sueros de las hembras se les realizó la prueba de tarjeta para *Brucella* y el ELISA para clamidiasis. El líquido abomasal extraído de los mortinatos, mismo al que se le realizó aislamiento y extracción de ADN, se procesó para la prueba de PCR que detecta *Brucella* spp. y *S. abortusovis*.

7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se realizó para la detección de ADN genómico, utilizando PCR multiplex para el caso de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, y pruebas de PCR independientes para *S. abortus ovis* y *Brucella* spp.

La extracción de ADN se realizó mediante dos métodos: un estuche comercial *Quick-DNA* Miniprep (Zymo research, EUA) según las instrucciones del fabricante (anexo 1) y mediante un protocolo de extracción denominado “fenol-cloroformo” (anexo 2).

Para realizar la PCR, se utilizó una mezcla comercial tipo Máster Mix y los iniciadores específicos de cada agente (cuadro 1). Estos se colocaron en un tubo microcentrífugo para PCR junto con el ADN molde de cada agente, los iniciadores y el agua a un volumen final de 25 µl (cuadro 2). En el caso de *C. pseudotuberculosis*, se realizó un PCR múltiplex, en donde se utilizaron 3 pares de iniciadores. Se colocaron las muestras en el termociclador programado con las condiciones de amplificación establecidas previamente (cuadro 3). Con una desnaturalización inicial, se determinó la temperatura y el tiempo de acuerdo con las características del ADN utilizado. Se realizaron los ciclos sucesivos de desnaturalización, alineamiento y extensión. Finalmente, una última extensión para

permitir que la polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos. Se realizó la lectura de resultados mediante electroforesis en gel agarosa al 2% con TAE 1X como amortiguador de corrida. El gel se visualizó en un lector de rayos UV (Serrato *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Iniciadores utilizados en las PCRs para cada agente infeccioso.

Microorganismo	Nombre del iniciador	Secuencia (5´ - 3´)	Producto de amplificación (pb)
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	16S-F	ACC GCA CTT TAG TGT GTG TG	816
	16S-R	TCT CTA CGC CGA TCT TGT AT	
	C2700F	CGT ATG AAC ATC GGC CAG GT	446
	C3130R	TCC ATT TCG CCG AAG CGC TG	
	PLD-F	ATA AGC GTA AGC AGG GAG CA	203
	PLD-R2	ATC AGC GGT GAT TGT CTT CCA GG	
<i>Brucella spp</i>	F4	TCG AGC GCC CGC AAG GGG	900
	R2	AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA	
<i>Salmonella abortusovis</i>	IS200	CGA TGA AAG CGT AAA TAA GG TTC TCT TGT CAG TCT CAA AC	900
<i>Staphylococcus spp</i>	23s rRNA	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1250
	ADNr 16S	GTA GGT GGC AAG CGT TAT CG CGC ACA TCG TCA G	228

Cuadro 2.- Componentes de reacción de la PCR para diversos agentes.

Microorganismo	Componente	Volumen/Reacción
<i>Brucella</i> spp	PCR Master Mix	6.5 µL
	FW ₁	2.5 µL
	Rv ₂	2.5 µL
	ADN	2 µL
	H ₂ O	11.75 µL
	Volumen final	25 µL
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	PCR Master Mix	12.5 µL
	15S-F	0.25 µL
	16S-R	0.25 µL
	C 2700 F	0.1 µL
	C 3130 R	0.1 µL
	PLD F	0.1 µL
	PLD R2	0.1 µL
	H ₂ O	5.6 µL
	ADN	1 µL
	Volumen final	25 µL
<i>Salmonella abortusovis</i>	PCR Master Mix	6.5 µL
	IS200 _F	2.5 µL
	IS200 _R	2.5 µL
	ADN	2 µL
	H ₂ O	11.75 µL
	Volumen final	25 µL
<i>Staphylococcus</i> spp	PCR Master Mix	6.5 µL
	16S	2.5 µL
	23S	2.5 µL
	ADN	2 µL
	H ₂ O	11.75 µL
	Volumen final	25 µL

Cuadro 3.- Condiciones de amplificación de las PCRs para detectar diferentes bacterias.

Microorganismo	Etapa	Temperatura y tiempo	Ciclos
<i>Brucella</i> spp	Desnaturalización inicial	95°C durante 10 minutos	1
	Desnaturalización	95°C durante 30 segundos	30
	Hibridación	45°C durante 90 segundos	
	Extensión	72°C durante 90 segundos	
	Extensión final	72°C durante 10 minutos	1
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Desnaturalización inicial	95°C durante 3 minutos	1
	Desnaturalización	95°C durante 60 segundos	40
	Hibridación	58°C durante 40 segundos	
	Extensión	68°C durante 90 segundos	
	Extensión final	68°C durante 90 segundos	1
<i>Salmonella abortusovis</i>	Desnaturalización inicial	95°C durante 3 minutos	1
	Desnaturalización	94°C durante 30 segundos	40
	Hibridación	51.6°C durante 30 segundos	
	Extensión	72°C durante 60 segundos	
	Extensión final	72°C durante 5 minutos	1
<i>Staphylococcus</i> spp	Desnaturalización inicial	95°C durante 5 minutos	1
	Desnaturalización	95°C durante 30 segundos	15
	Hibridación	68°C durante 30 segundos	
	Extensión	72°C durante 30 segundos	
	Extensión final	72°C durante 2 minutos	1

7.3 Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)

Esta técnica se realizó para detectar *B. ovis* e *H. somni*.

Para el caso de *B. ovis*, se utilizó como base antigénica un extracto salino caliente de *B. ovis* cepa REO 198 elaborada en el laboratorio de diagnóstico del CENID Salud Animal e Inocuidad, sede Palo Alto, INIFAP (Diaz *et al.*, 2001). Para *H. somni* se utilizó un antígeno obtenido por sonicación (anexo 3).

La IDGA es una técnica de precipitación que se basa en la aparición de un precipitado visible cuando hay antígenos solubles con sus anticuerpos específicos (Nava *et al.*, 2012). En una caja de Petri desechable con gel de agarosa (anexo 4) se perforan pocillos en forma de roseta con un pozo central rodeado por 6 pozos periféricos, el pozo central se llena con 15 a 30 μ L de antígeno, mientras que en los pozos periféricos se coloca de 15 a 30 μ L de los sueros problema, se colocan también un suero control negativo y otro control positivo. Se incuba el gel en cámara húmeda a temperatura ambiente por cuatro días, una línea de precipitación entre el antígeno y el suero problema indica un resultado positivo.

7.4 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

El ELISA es una técnica muy usada para medir anticuerpos, antígenos, proteínas y glicoproteínas en muestras biológicas. Se llevan a cabo en microplacas que permiten medir múltiples muestras en un solo ensayo (Horlock, 2018).

Este ensayo se realizó para medir anticuerpos de *Chlamydia* y *C. pseudotuberculosis* de acuerdo con el procedimiento descrito por Corona, (2011).

Se sensibilizó una microplaca de poliestireno con el antígeno diluido 1:80, colocando 50 μ l del antígeno por pozo y se incubó 24 horas a 4°C. Después de este periodo la placa se lavó cuatro veces con 300 μ l de PBS-Tween 20. La placa fue bloqueada colocando 50 μ l de leche descremada por pozo al 3% por una hora y se realizó nuevamente el lavado de la placa.

Se colocaron 50 μ l del suero problema (anticuerpo primario) a una dilución de 1:20 en cada pozo, incluyendo los controles positivos y negativos, se incubó una hora a 37°C, transcurrido este tiempo se realizó otro lavado de la placa. Posteriormente se

colocó el anticuerpo secundario a una dilución de 1:1000 colocando 50 µl en cada uno de los pozos, se cubrió con papel aluminio y se incubó a 37°C por una hora. Se hicieron nuevamente lavados de la placa y finalmente se adicionó a cada pozo 50 µl de 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) y se mantuvo en oscuridad 5 minutos.

Se realizó la lectura de la placa en un espectrofotómetro a una longitud de 405 nm con la ayuda del programa de cómputo Gen5.

7.5 Técnicas de aglutinación (tarjeta)

La técnica se realizó de acuerdo con la NOM-056-ZOO-1995: especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria. Sirve como prueba tamiz para la detección de brucelosis por su alta sensibilidad y es utilizada para controlar y/o erradicar la infección en un rebaño o hato. La prueba consiste en colocar una gota de 30 µL de muestra de suero y 30 µL de antígeno con el colorante Rosa de Bengala (concentración de 3% en ovinos y caprinos y de 8% en bovinos), mezclar con rotación para obtener una muestra homogénea, se realiza la lectura con el aglutinoscopio inmediatamente después de mezclar, la prueba se considera positiva cuando existe cualquier grado de aglutinación, se detecta la presencia de anticuerpos circulantes de tipo IgG e IgM de origen vacunal o por infección secundaria.

7.6 Aislamiento bacteriano

Las muestras para realizar el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* se sembraron por el método de dilución en agar sangre al 5% y se dejaron incubar por 48 horas a 37°C. Se seleccionaron las colonias pequeñas de color blanco y de consistencia seca, se realizó tinción de Gram para la observación microscópica.

7.7 Coproparasitoscópicos (flotación)

La técnica se realizó colocando en vasos de precipitado 1 g de materia fecal, se añadió aproximadamente 50 ml de solución saturada de NaCl se homogenizó y se coló en otro vaso, se dejó reposar por 15 minutos y con un asa de platino se

colocaron 3 gotas de la superficie de la mezcla en el portaobjetos para observar en el microscopio.

7.8 Sedimentación

La técnica consistió en colocar en un vaso 1 g de materia fecal, se agregó aproximadamente 100 ml de agua y homogenizó para posteriormente colarlo en otro vaso, se dejó reposar 10 minutos. Posteriormente el sobrenadante se decantó y se conservó el sedimento. Lo anterior se repitió de 2 a 3 veces y finalmente se colocó el sedimento en una caja Petri con colorante para su observación en el microscopio.

8. RESULTADOS

Las unidades de producción se ubican principalmente en comunidades del Estado de México, sin embargo, por la cercanía y oportunidad, se visitaron unidades de producción en los Estados colindantes como del Estado de Hidalgo.

Se recibieron un total de 344 muestras de animales que mostraron un cuadro clínico sugerente de alguna enfermedad de tipo infecciosa, las cuales se procesaron según las pruebas disponibles y las más adecuadas para la identificación de cada agente etiológico basado en el diagnóstico clínico.

Para aquellas enfermedades que se consideraban de tipo reproductivo, ya sea por la presencia de abortos, la orquitis o epididimitis en los machos, o signos tales como: retención de placenta, presencia de mortinatos o de crías nacidas débiles, se les realizaron pruebas de diagnóstico para la identificación de brucelosis, considerando para las brucelas lisas la prueba de tarjeta al 3% y para las brucelas rugosas (*B. ovís*) la prueba de IDGA.

En las pruebas mencionadas resultaron 94 (31.7%) animales positivos a brucelas lisas (Fig. 1), de los cuales 90 fueron de una sola unidad de producción (75%) procedentes de la UP ubicada en Pachuca, Hidalgo. Derivado de este resultado y debido a que la UP tuvo en ese momento dos mortinatos recientes, se decidió extraer el líquido abomasal de los mismos para el aislamiento de *Brucella*. Después del periodo de incubación a 37°C durante 6 días, se observó el crecimiento de colonias circulares con bordes regulares y translúcidas, sugerentes de *Brucella*. La identificación del agente en estas colonias se realizó a través de la PCR específica para *Brucella* spp., junto a otras dos muestras de líquido abomasal que se habían remitido de otra unidad de producción tiempo atrás. Todas las muestras dieron resultado negativo, por esta razón se realizó adicionalmente la PCR para identificar *S. abortusovis* como diagnóstico diferencial, sin embargo, los resultados fueron negativos también.

Así mismo, a todos los sueros positivos a la prueba de tarjeta, de forma complementaria se realizó la prueba de ELISA, utilizando dos antígenos diferentes:

el hapteno nativo (HN) y de lipopolisacáridos (LPS) de *Brucella*. En la prueba con el HN resultaron 49 animales positivos (16.5%) y el resto negativos, sin embargo, en la prueba en la que se utilizó LPS como antígeno resultaron 73 animales positivos (24.7%) y el resto negativos, de los cuales 21 animales resultaron negativos a ambas pruebas.

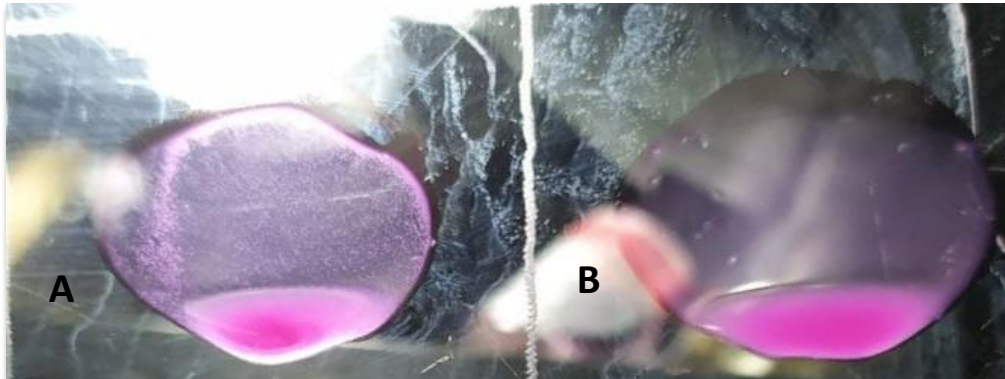


Fig. 1. Resultados tarjeta utilizando rosa de bengala, siendo en el que se ve un resultado positivo con abundante aglutinación (A) y en el que se considera resultado negativo donde no se aprecia aglutinación (B)

En el caso de las brucelas rugosas se tomaron en cuenta principalmente los sueros obtenidos de los machos que presentaron signos clínicos de orquitis y epididimitis o que, a pesar de ser asintomáticos se sospechaba de infección. Se tomaron un total de 150 muestras.

A estos animales se les realizó la prueba de IDGA para *B. ovis*, dando como resultado 15 animales positivos (10%) de diferentes unidades de producción, tanto en Hidalgo como en el Estado de México (Fig. 2). Adicionalmente las muestras positivas fueron evaluadas de forma complementaria con la prueba de ELISA, de los cuales, 14 fueron positivos (9.3%) nuevamente en distintas unidades de producción en ambos Estados.

Así mismo, y a pesar de ser positivos a brucelosis en las pruebas previamente descritas y considerando la posibilidad de infecciones múltiples, a los mismos sueros de estos machos se les realizó la prueba para histofilosis. Primeramente, con IDGA, de las cuales resultaron 8 positivos (5.3%) y 5 sospechosos. De igual manera, a estas muestras se les realizó la prueba de ELISA complementaria,

resultando los mismos 8 animales positivos a histofilosis, distribuidos en dos unidades de producción en ambos Estados donde se muestreo.

De estos animales, hubo tres que resultaron positivos tanto a *B. ovis* como a *H. somni*, todos de la misma Unidad de Producción ubicada en el Estado de México y que presentaban problemas de orquitis y epididimitis. Así mismo, uno de los animales perteneciente a una unidad en Hidalgo resultó positivo a *Chlamydia* spp.

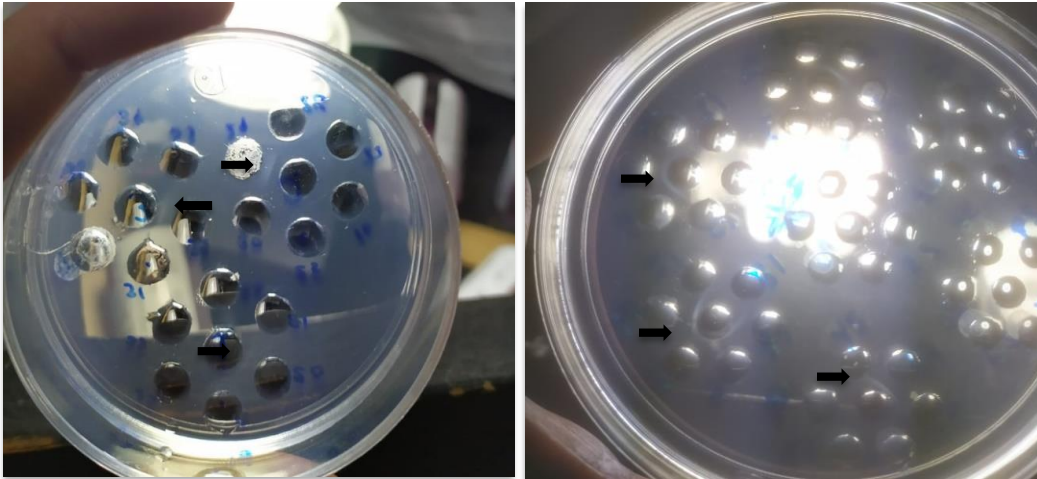


Fig. 2. Resultados positivos IDGA, en donde se ve la aglutinación y se considera como resultado positivo (flechas)

A los sueros con diagnóstico clínico de enfermedad reproductiva, se les realizó prueba para clamidiasis. Para dicha prueba, se utilizó la técnica de ELISA, resultando 41 (24%) animales positivos y el resto negativos. Estos animales positivos procedían de 2 UP diferentes, localizándose una en el Estado de México y la otra en Hidalgo.

Los casos sospechosos a la infección de *C. pseudotuberculosis* fueron aquellos animales que se observaron con los característicos abscesos producidos por el agente. Se tomaron muestras de sangre a todos estos animales, además de algunos animales de la misma UP aparentemente sanos. A los que fue posible el tratamiento del absceso se hizo la extracción de muestra por hisopado.

Se tomaron en total 15 hisopados y se separaron 23 sueros, incluyendo 5 muestras de animales aparentemente sanos. En los 15 hisopados se aislaron colonias

blancas, secas, con una consistencia yesosa sugerente a *Corynebacterium* spp. La tinción de Gram mostró bastones rectos con una agrupación clásica en letras chinas característica de *C. pseudotuberculosis* (Fig. 3). Se hizo una extracción de ADN para su identificación por PCR multiplex específico de *C. pseudotuberculosis*, del cual resultó que los 15 aislamientos fueron positivos. En los 15 aislamientos se observó la amplificación de la región rpoB, en tres aislamientos además de esta región, se observó la amplificación de otras dos regiones genéticas de *C. pseudotuberculosis* que fueron RNA16s y pld incluidas en la PCR multiplex (Fig. 4). De igual manera se realizó la prueba de ELISA para *Corynebacterium* con las muestras de suero de todos estos animales, de los 23 sueros representativos de todos los animales, 17 fueron positivos y los 6 restantes fueron negativos, de los 17 positivos, hubo 2 muestras que fueron de animales aparentemente sanos.

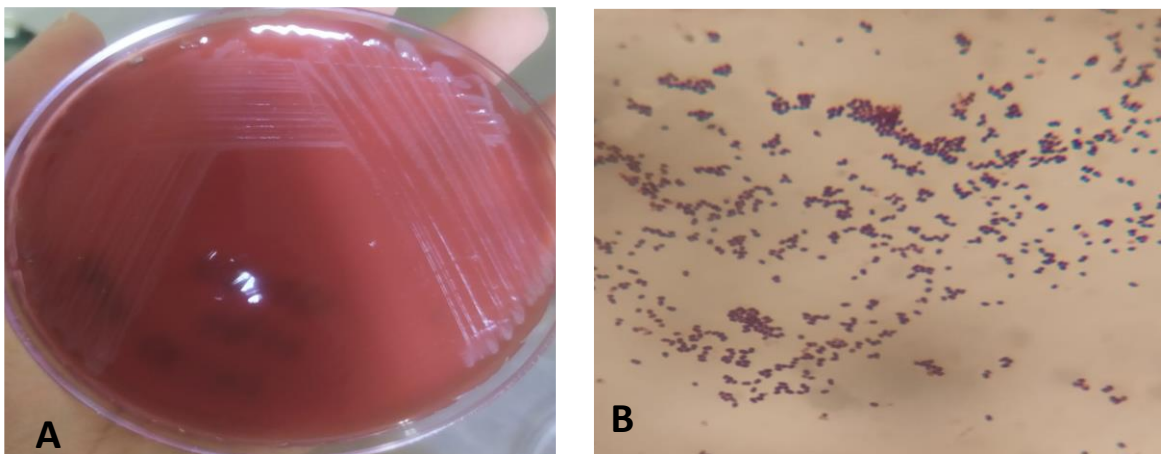


Fig. 3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: morfología bacteriana en agar sangre con técnica de estría cruzada (A) y a visión de microscopio con tinción de gram (B).

Cinco aislamientos obtenidos de hisopados en diferentes unidades de producción presentaron morfología sugerente a *Staphylococcus* spp, se realizó la tinción de Gram para su posterior revisión al microscopio en donde se evidenciaron bacterias en forma de cocos, con agrupación en racimos o cadenas (Fig. 5), debido a que estas bacterias y la morfología de las colonias son sugestivas a *Staphylococcus* spp., por lo cual, se decidió también realizar una PCR para este agente infeccioso para confirmar la presencia de dicha bacteria, en donde las 5 muestras resultaron positivas al gen 16s ARN.

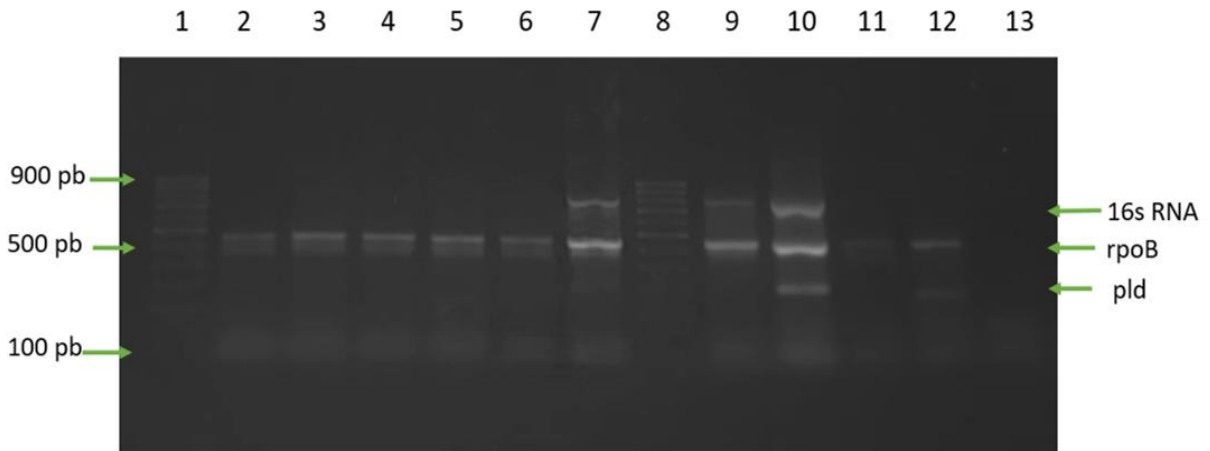


Fig. 4.- Perfil de amplificación de la PCR multiplex para *Corynebacterium pseudotuberculosis* de muestras de ovino. Carril 1 y 8. Marcador de pares de bases. 2-7. Productos finales de muestras de ovino. 9-11. Productos finales de muestras de caprinos. 12. Control positivo. 13. Control negativo. Muestras del carril 2-6, 11 positivas al gen rpoB. Muestras 7, 9 y 10 positivas a .fragmentos genéticos de *C. pseudotuberculosis*. pld, rpoB y 16s RNA: iniciadores específicos para *C. pseudotuberculosis*, pb: pares de base.

Para el diagnóstico parasitario las muestras de heces fueron evaluadas por las pruebas de flotación y sedimentación. De las 21 muestras de animales procedentes de una sola unidad de producción, solamente en 5 animales se identificó la presencia de nematodos gastrointestinales en la prueba de flotación, sin embargo, no se realizó la identificación de las especies encontradas.

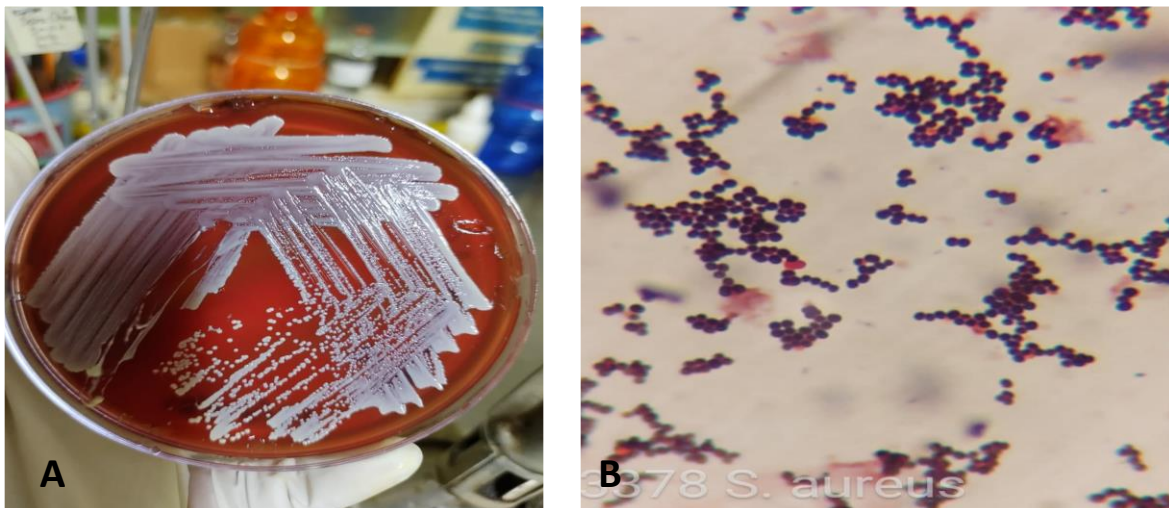


Fig. 5. de *Staphylococcus* spp: morfología bacteriana en agar sangre con técnica de estría cruzada (A) y a visión de microscopio con tinción de gram (B)

Cuadro 4.- Resultados finales obtenidos de diferentes unidades de producción de ovinos y caprinos en distintas regiones geográficas. Se describe la enfermedad infecciosa y el tipo de técnica que se utilizó para su identificación.

Enfermedad	# de muestras	Tipo de muestra	Técnica	Resultados	Estado
Brucelosis (Brucelas lisas)	296	Sueros	Técnica de tarjeta 3%	94 positivos, 202 negativos (31.7%)	Hidalgo y Estado de México
	4	Líquido abomasal	Aislamiento y PCR	Negativos	Estado de México
	94	Sueros	ELISA	HN: 49 positivos y 45 negativos (16.5%) LPS: 73 positivos y 21 negativos (24.7%)	Hidalgo
Brucelosis (Brucelas rugosas: <i>B. ovis</i>)	150	Sueros	IDGA	15 positivos, 135 negativos (10%)	Hidalgo y Estado de México
	15	Sueros	ELISA	14 positivos y 1 negativo (9.3%)	Estado de México
Linfadenitis caseosa	23	Sueros	ELISA	17 positivos y 6 negativos	Estado de México
	15	Exudados	Aislamiento y PCR	Aislamiento: 15 positivos PCR: 15 positivos a <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Estado de México
Clamidiasis	171	Sueros	ELISA	41 positivos y 130 negativos (24%)	Hidalgo y Estado de México
Histofilosis	150	Sueros	IDGA	8 positivos, 5 sospechosos y 137 negativos (5.3%)	Hidalgo y Estado de México
	13	Sueros	ELISA	8 positivos y 5 negativos	Estado de México
Salmonelosis (<i>Salmonella abortusovis</i>)	4	Líquido abomasal	Aislamiento y PCR	Negativos	Estado de México
Nematodos gastrointestinales	21	Heces	Flotación y sedimentación	5 positivos a flotación	Estado de México
<i>Staphylococcus</i> spp	5	Hisopados	Aislamiento y PCR	5 positivos	Estado de México

Cuadro 5.- Resultados finales obtenidos de diferentes unidades de producción de ovinos y caprinos en distintas regiones geográficas. Se describe el porcentaje de animales positivos según la unidad de producción

Enfermedad	UP	# de positivos	Porcentaje	Técnica	Estado
Brucelosis (Brucelas lisas)	1	0/120	0%	T3%	México
	2	0/100	0%		México
	3	0/50	0%		Hidalgo
	4	0/150	0%		México
	5	T3%:90/120 E-HP: 49/120 E-LPS: 73/120	T3%: 75% E-HN: 40.8% E-LPS:60.3%	T3%, ELISA	Hidalgo
Bucelosis (Brucelas rugosas: <i>B. ovis</i>)	1	4/120	3.3%	IDGA	México
	2	9/100	9%		México
	3	2/50	4%		Hidalgo
Linfadenitis caseosa	3	2/50	4%	ELISA	Hidalgo
	4	7/150	4.6%		México
Clamidiasis	2	27/100	27%	ELISA	México
	3	10/50	20%		Hidalgo
	4	4/150	2.6%		México
	5	0/120	0%		Hidalgo
Histofilosis	1	4/120	3.3%	ELISA	México
	2	4/100	4%		México
	3	0/50	0%		Hidalgo
Salmonelosis	5	0/2	0%	Aislamiento y PCR	Hidalgo
Nematodos gastrointestinales	UPX	5/21	23.8%	Flotación y sedimentación	México
<i>Staphylococcus</i> spp.	UPX	5/20	25%	Aislamiento y PCR	México

NOTAS: T3%: Prueba de Tarjeta al 3%, E-HN: Prueba de ELISA utilizando como antígeno el hapteno nativo, E-LPS: Prueba de ELISA utilizando como antígeno de lipopolisacáridos, UPX: Unidades de producción incluidas en el trabajo de las cuales no se visitaron o describieron.

9. DISCUSIÓN

De las muestras totales analizadas en el presente estudio, hubo 296 con diagnóstico clínico asociado con enfermedades reproductivas, de éstas, 94 fueron positivas (31.7%) a brucelas lisas con la técnica de tarjeta, mientras que en la prueba de ELISA utilizando HN y LPS de *Brucella* resultaron 49 y 73 positivos respectivamente, esto podría ser debido a que la prueba de ELISA que utiliza como base antigénica el hapteno nativo tiene una especificidad mayor al 90% lo que en el diagnóstico permite diferenciar animales infectados de vacunados (Miranda *et al.*, 2012), por lo que se considera confirmatorio, por lo tanto, se podría decir que los 49 positivos con el antígeno HN son realmente positivos, sin embargo, de los 24 resultados de diferencia entre la ELISA con HN y LPS, estos podrían ser falsos negativos

De acuerdo con lo reportado por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVE), en el periodo comprendido de la semana 1 a la semana 44 del año 2021, se confirmaron 6 casos de brucelosis ovina en el Estado de Hidalgo y 44 en el Estado de México. Sánchez y Arteaga reportaron (2019) reportaron una variación en los casos reportados por el SIVE y los casos reales en el Estado de Hidalgo, siendo mayor los casos reales que los reportados, lo cual es consistente con los 49 casos confirmados en Hidalgo en la presente investigación respecto a los 6 casos reportados en el SIVE, esto también podría deberse a que usualmente los laboratorios que reportan al SIVE no son laboratorios que se especialicen en el diagnóstico de enfermedades reproductivas, por lo que no reciben casos sospechosos a brucelosis, debido a ello no se tiene resultados fidedignos de la situación actual de brucelosis en esta región. Sin embargo, a pesar de que en el Estado de México se reportaron 44 casos de brucelosis, no se encontró ningún caso en las UP visitadas, por lo que no es un problema relevante en tales unidades del Estado de México.

En estudios realizados en el Estado de Puebla resultaron 48 animales positivos (8.1%) a *Brucella* spp. de 590 muestras totales (Hernández *et al.*, 2016), con lo cual, se observaron resultados similares en otro estudio en el Estado de Durango, donde se encontraron 19 animales positivos (5.8%) a brucelosis en una población de 333

animales (Ortega *et al.*, 2009). Contrastando con el Estado de Veracruz en donde de una población de 414 animales, resultaron solamente 4 positivos (Román, 2016). De lo anterior descrito, se puede observar que la cantidad de animales positivos en relación con la población total en este estudio es mucho mayor a la reportada en otros Estados y otros estudios, las 49 muestras positivas obtenidas de la evaluación de 296 (16.5%) animales permiten considerar que la brucelosis es un problema de gran importancia en la unidad de producción de donde derivaron la mayor parte de los casos en el Estado de México.

El 71.1% del territorio nacional presentan casos de brucelosis activa, ya que los esfuerzos que se realizan para erradicar la infección no son suficientes, sumado a la desinformación de los ganaderos para prevenir y controlar la brucelosis (Ordoñez *et al.*, 2021), lo cual se evidenció en la UP de donde se obtuvieron los casos positivos a brucelosis, ya que el productor encargado no estaba al tanto de la existencia de esta infección y de las medidas que se tenían que tomar para su prevención. Siendo así que, al momento de adquirir nuevos sementales, no se aseguró que fueran libres de *Brucella*, no se realizó cuarentena y se realizó la cruce con monta directa; posteriormente es cuando presentó más de 50 abortos en su UP, y resultaron positivos un gran porcentaje de animales, evidenciando el gran problema de brucelosis que se tenía, por lo que es notoria la importancia de la difusión de información sobre las enfermedades infecciosas, así como sobre su control y prevención.

Al realizar la prueba de PCR al ADN extraído del líquido amniótico obtenido del abomaso de los dos mortinatos procedentes de la misma UP, esta prueba resulto negativa tanto a *Brucella* spp. como a *S. abortusovis*, esto puede deberse a que estos animales si llegaron a término, nacieron y en el proceso murieron, por lo que es posible que no aspiraran realmente líquido amniótico, lo cual causaría que se obtuvieran resultados negativos a pesar de saber que provenían de las mismas madres brucelosas de la UP.

Brucelosis por *B. ovis*: resultaron 15 animales positivos (10%) en IDGA de una población de 150 ovinos, mientras que en la prueba de ELISA resultaron 14

muestras positivas (9.3%) distribuidas en tres UP en el Estado de México y en Hidalgo. Estos resultados son similares a los reportados en un estudio realizado en carneros del altiplano mexicano, en el cual se encontraron 10 animales positivos (9%) en una población de 111 carneros. En ese mismo estudio se realizó la prueba de ELISA, teniendo una seroprevalencia del 22.5% (Méndez *et al.*, 1999). En otros estudios en el Estado de Zacatecas, se identificó inicialmente una prevalencia del 18.6% (Carrera *et al.*, 2013), mientras que, en un estudio posterior en el mismo Estado, en una población de 552 animales, 90 resultaron positivos a *B. ovis* (16.5%), siendo la prevalencia inicial mayor a la del estudio actual (Gutiérrez *et al.*, 2015). A pesar de no presentar una prevalencia tan alta como en otros estudios en otras regiones del país, este agente sigue considerado relevante, ya que sigue causando problemas de salud en los animales, ocasionando pérdidas económicas significativas en las unidades de producción en donde se presenta.

Histofilosis: en esta misma población de 150 animales se realizó la prueba de IDGA y ELISA para *H. somni*, identificando en ambas pruebas 8 muestras positivas (5.3%), tres de estos animales fueron positivos tanto a *B. ovis* como a *H. somni*, coincidiendo con los resultados del estudio del 2015 por Gutiérrez *et al.* en el Estado de Zacatecas, donde de los 552 muestras analizadas, hubo 36 animales positivos (6.5%) a *H. somni* de los cuales cinco animales fueron positivos también a *B. ovis*, evidenciando a este último como un agente de importancia causante de epididimitis y que puede estar en asociación (coinfeción) con *B. ovis*. De igual manera uno de los animales positivos a *B. ovis*, resultó positivo a la prueba de ELISA de *Chlamydia*. Ambos casos vinculados a infecciones concurrentes en estos animales, lo que sugiere que la frecuencia de epididimitis en ovinos del Estado de México e Hidalgo puede estar asociada a agentes infecciosos diferentes a *B. ovis*.

Linfadenitis caseosa. se colectaron y se obtuvieron un total de 23 muestras de sueros, entre las cuales había 5 de animales aparentemente sanos. Se obtuvieron 17 resultados positivos a la prueba de ELISA, 15 correspondían a animales con enfermedad clínica (presencia de abscesos) y dos a animales aparentemente sanos. Esto puede deberse a que la linfadenitis tiene una presentación con

abscesos en cabeza y cuello y una presentación visceral, en la cual, a pesar de que los animales no presentaron estos nódulos característicos, pueden presentar la enfermedad en su otra presentación (Acosta *et al.*, 2018), lo cual justifica los resultados positivos a la prueba de ELISA realizada. En otros estudios realizados en México en el año 2019, se encontró una prevalencia de la infección del 33% con 57 positivos de un total de 160 muestras analizadas (Hernández *et al.*, 2019), mientras que en otros estudios más antiguos se reporta una prevalencia del 5.4% (Ochoa *et al.*, 1994). Por lo que se puede decir que desde hace años la linfadenitis caseosa es una enfermedad que ha estado presente en las unidades de producción ovina causando pérdidas económicas y de la cual es necesario establecer las medidas de prevención para su control.

De los 15 hisopados utilizados al aislamiento se logró en las 15 muestras crecimiento bacteriano con morfología sugerente a *C. pseudotuberculosis*, de estos aislamientos, se realizó la PCR, en la cual se obtuvieron las 15 muestras positivas al gen *rpoB* y tres de estas muestras positivas a las demás regiones genéticas RNA16s y *pld* que amplifica esta PCR multiplex. Según Montes de Oca *et al.* (2019) los análisis basados en el gen *rpoB* son considerados de elección para *C. pseudotuberculosis*, ya que ayuda a diferenciar a nivel subespecie en contraste con otras regiones genéticas como 16s ARN (Pavan *et al.*, 2012); por lo que con estos resultados se confirma el diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* de las 15 muestras analizadas.

Staphylococcus spp.: se identificaron en 5 muestras de hisopados, posterior al aislamiento y observación al microscopio, la morfología sugerente a *Staphylococcus spp.*, se realizó la PCR y las 5 muestras resultaron positivas al gen 16s ARN y negativas al gen 23s, de los cuales según Sunagar *et al.*, (2013) el gen 16s ARN puede ser identificado en el caso de diferentes géneros de bacterias, incluyendo diversas especies de *Staphylococcus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi*, por lo que no se puede considerar el resultado de la prueba positiva a la especie *S. aureus*, pero si se podría considerar positiva a *Staphylococcus spp.* debido a que es el único agente infeccioso que está

relacionado con abscesos purulentos. Hay registro del 2015 en un estudio por Velázquez *et al.* en donde se encontró en el Estado de México con una prevalencia del 44.2% de *S. aureus* y 19.6% de *Staphylococcus* coagulasa negativa en muestras de leche, lo que indica que, si es un agente infeccioso que está presente en la región infectando ovinos, causando diferentes cuadros clínicos y pérdidas económicas.

Clamidiasis: de las 171 muestras a las que se les realizó la prueba de ELISA para clamidiasis, se obtuvieron 41 animales positivos (24%). En contraste, en un estudio realizado en el Estado de Sonora donde utilizaron la técnica de aislamiento a partir de una población de 125 animales, se obtuvieron 69 resultados positivos, lo cual demostró una prevalencia mucho mayor de la infección (55.6%) (Castro-Flores *et al.*, 2021), mientras que Sánchez *et al.* (2021) utilizando de igual manera la técnica de aislamiento, reportó 43 animales positivos (23.2%) en diferentes regiones del país, lo cual es similar a los resultados de este trabajo.

De los 41 animales positivos a clamidiasis, 10 fueron del Estado de Hidalgo (19.6%), mientras que los restantes 31 fueron provenientes del Estado de México (34.4%), lo cual concuerda con otro estudio realizado en diferentes Estados de México, donde se utilizó la prueba de ELISA dando como resultado en el Estado de Hidalgo una prevalencia del 11.3% con 97 positivos de 855 animales y en el Estado de México 43.3% con 140 positivos de 323 animales. En este mismo estudio, también se encontraron casos positivos en los Estados de Tlaxcala, Sonora, Chihuahua, Chiapas y Querétaro (Palomares *et al.*, 2020). Estos resultados indican que la clamidiasis es una enfermedad infecciosa muy presente en las unidades de producción del país.

De los animales antes mencionados procedentes del Estado de Hidalgo, estos presentaban historial de abortos y de nacimiento de crías débiles. Los machos sexualmente activos también fueron positivos a la infección, lo cual sugiere que el uso de machos infectados con clamidias se debe considerar como un factor de riesgo de presencia y transmisión de la infección por vía sexual a las hembras del rebaño, concordando con lo encontrado por Flores *et al.* (2021) y Teankum *et al.* (2007), en los cuales se demuestra la presencia de *Chlamydia* en el semen de

ovinos. Por otra parte, los animales procedentes del Estado de México no presentaban historial de abortos, sin embargo, de acuerdo con el propietario de la UP estos fueron adquiridos de otros sitios en los que se tienen antecedentes de enfermedades reproductivas, por lo que considerando esto último, es un factor de riesgo de importancia para el contagio de la infección.

Nematodos gastrointestinales: se encontraron 5 animales positivos de 21 muestras totales (23.8%), todas provenientes de la misma UP en el Estado de México, lo cual es mucho menor que diversos estudios realizados igualmente en el Estado de México, en donde la prevalencia reportada oscilo del 80-90% en dos comunidades del Estado y el nematodo gastrointestinal más común identificado fue *Haemonchus* spp., (Sánchez, 2017). Por otro lado, Figueroa *et al.*, (2018) identificaron una prevalencia del 52.4% en el Estado de Guerrero. Los resultados de estos estudios muestran las altas prevalencias de parasitosis por diversos nematodos gastrointestinales, haciéndolos un gran problema de salud animal, lo cual está muy ligado al mal uso de antiparasitarios y al desconocimiento del problema sanitario por los productores ovinos del país.

Con los resultados obtenidos se pudo determinar la presencia de varias enfermedades infecciosas que afectan las unidades de producción ovina en la zona del Estado de México e Hidalgo, además de las inicialmente mencionadas al principio de este estudio, se encontraron infecciones por *Staphylococcus* spp. y parasitosis por nematodos gastrointestinales. Se encontró una alta prevalencia de brucelosis y de linfadenitis caseosa, así como una importante prevalencia de histofilosis y clamidiasis. Algunas de estas enfermedades nunca fueron consideradas por los productores, por lo que no se establecían medidas de control y profilaxis, lo que evidencia la importancia de reconocer las enfermedades de mayor importancia en la zona, para capacitar a los productores respecto a las opciones de estrategias de control y prevención que pueden disminuir o evitar las pérdidas económicas que afectan la producción ovina de la región y del país.

10. CONCLUSIONES

- Con la aplicación de diferentes técnicas de diagnóstico se pudo determinar la presencia de infecciones consideradas comunes en poblaciones ovinas.
- Adicionalmente se encontraron otras infecciones, como las producidas por *Staphylococcus* spp. y por nematodos gastrointestinales.
- Se presentó una alta prevalencia de agentes relacionados con enfermedades reproductivas como la brucelosis (tanto por brucelas lisas como por rugosas) y linfadenitis caseosa.
- Se evidenció la asociación de agentes infecciosos causando epididimitis en carneros (*H. somni* con *B. ovis* y *B. ovis* con *Chlamydia* spp).
- Hay una evidente falta de información en las diferentes unidades de producción sobre las enfermedades más comunes en ovinos de la zona, así como de su prevención y control.

11. REFERENCIAS

1. Aguilar FR, Trigo FJ, Herrera EL, Ávila JG, Suárez FG. *Histophilus somni* aislado en casos de problemas del aparato reproductor de ganado. Primer informe en México. *Técnica Pecuaria en México* 2005;43(2):185-195.
2. Álvarez LP, Mignaqui AC, Robles CA. Diagnóstico de enfermedades del ganado utilizando técnicas moleculares. *Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria; Presencia* 2016;65(6)16-20.
3. Álvarez MG, Saldaña CF, Ballesteros MR, Martínez IO, López AM, Briones EL, Morales AL. Comparación de las pruebas: reacción en cadena de la polimerasa, serología y hemocultivo con respecto a sensibilidad y especificidad, para la detección de *Brucella* spp en muestras humanas. *Gaceta Medica de México* 2015;151:620-627.
4. Arrevillaga LC, Escalante OC, Ducoing WA. Reconocimiento de la clamidiasis caprina en México (tesis licenciatura) Ciudad de México. FMVZ-UNAM. 2007.
5. Barrientos PJS, Cortez DN, Tortora PJL, Del Rio GJC, Valdivia AG. Diferentes biotipos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista Electrónica de Clínica Veterinaria*. 2008;34:1-27.
6. Belchior SE, Gallardo AA, Álvarez LO, Callejo DR, Prieto M, Jodor NJ, Jensen OA. Diagnóstico de pseudotuberculosis en ovinos patagónicos. *Revista Argentina de Microbiología*, 2007;39:44-46.
7. Carrera CJ, Echavarría CF, Aréchiga FC, Bañuelos R, Tortora PJ. Consideraciones epidemiológicas en la prevalencia serológica de *Brucella ovis* en Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 2013;4(1):135-138.
8. Carrillo MF, Ortega JL, Hernández JR. Prevalencia de linfadenitis caseosa en hatos caprinos de la comarca lagunera de Durango. *Revista Chapingo serie Zonas Áridas*. 2005;4:51-56.
9. Casademunt SA. Importancia de *Histophilus somni* en la enfermedad respiratoria: una revisión. *Revista Cría y Salud*. 2008;21:60-64.

10. Castro FR, Gaxiola MS, Díaz AE, Limón GM, Romero JA, Enríquez VI, Castro CN, Rodríguez GMA, Montero PA, Díaz D. Prevalencia de *Chlamydia abortus* en cabras con problemas de aborto en la zona centro de Sinaloa, México. *Revista de Ciencias biológicas y de la Salud*. 2021; 23(3):142-150.
11. Coelho AC, García JD. Brucelosis en pequeños rumiantes: etiología, epidemiología, sintomatología, diagnóstico, prevención y control. *REDVET Revista Electrónica Veterinaria* 2014;15(5):5-32.
12. Díaz E, *et. al.* Diagnóstico de Brucelosis animal. Memorias “Cursos teórico práctico de Brucelosis animal”, INIFAP, IICA, OPS y Fundación Guanajuato Produce. 2001.
13. Espinoza AL. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. *Ecología molecular*. CONABIO y UNAM. 2007
14. Figueroa AA, Pineda RSA, Godínez JF, Vargas AD, Rodríguez BE. parásitos gastrointestinales de ganado bovino y caprino en Quechultenango, Guerrero, México. *Agroproductividad*. 2018;11(6):97-104.
15. Gutiérrez CI. Identificación de *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* a partir de muestras de semen (tesis de licenciatura) Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México. 2017
16. Gutiérrez, HJL, Garrido FGI, Acosta DJ, Díaz AE, Tenorio GVR, Tortora PJJ. Diagnóstico serológico, histopatológico y molecular de epididimitis ovina en carneros de Zacatecas, México. 2015;10(2):45-52.
17. Guzmán RH, Contreras AE, Ávila HGE, Morales RF. Brucelosis: zoonosis de importancia en México. *Revista Chilena INFECTOL*. 2016;33(6):656-662.
18. Headley SA, Pereira AHT, Balbo LC, Di Santia GW, Cunha LFC, Schade J, Okano W, Lisboa JAN. *Histophilus somni*-associated syndromes in sheep from Southern Brazil. *Brazilian journal of microbiology*. 2018;49:591-600.
19. Hernández FL. Caracterización molecular de *Corynebacterium pseudotuberculosis* aislado de muestras de casos clínicos de linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos (tesis de licenciatura). Estado de México Universidad Autónoma del Estado de México. 2015.

20. Hernández LF, Montes de Oca JR, Varela GJA, Acosta DJ, Morales EV, Monroy SHG. Análisis filogenético en aislados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de casos clínicos de linfadenitis caseosa en ovinos y caprinos. *Revista Académica de Ciencias Animales*. 2019;17(1):396-398.
21. Hernández HJ, Franco FJ, Camacho RJ, Tepalzingo CS, Hernández R. Localización y costos de brucelosis en cinco rebaños de cabras pertenecientes a cuesta blanca en el estado de Puebla, México. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 2016;38:307-316.
22. Horlock C. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) Imperial College of London. 2018.
23. Institute for International Cooperation in Animal Biologics (IICAB). Brucelosis ovina y caprina: *Brucella melitensis*. Iowa State University 2009.
24. Lloyd, SS. Linfadenitis caseosa en ovejas y cabras. Manual para la práctica veterinaria. 2000.
25. López GA. Estudio de Brucelosis causada por *Brucella ovis* en ovinos y personal en riesgo (tesis doctoral). Valencia. Universidad politécnica de Valencia. 2007.
26. Román, DL. Estudio epidemiológico de la brucelosis en las principales cuencas ovinas del Estado de Veracruz (tesis de licenciatura). Veracruz. Universidad Veracruzana. 2016.
27. Manazza J, Spath E, Paolicchi F. Brucelosis ovina. *Revista del Colegio de Veterinarios de Provincia de Buenos Aires, Argentina*. 2006;11(35):42-44.
28. Méndez NG, Díaz AE, Morales AJ, Aguilar RF, Suárez GF. Epididimitis ovina: Estudios bacteriológico y serológico. *Veterinaria México*. 1999; 30(4):329-336.
29. Miranda EG, Andrade LH, Aparicio ED. Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo, para diferenciar bovinos con revacunaciones repetidas con la cepa S19 de *Brucella abortus*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2012;44(2):269-276.
30. Mora JCD, Díaz EA, Herrera EL, Suárez FG, Escalante CO, Jaimes SV, Arrellano BR. Aislamiento de *Chlamydia abortus* en rebaños caprinos

- lecheros y su relación con casos de aborto en Guanajuato, México. *Revista Veterinaria México OA* 2015;2(1):98-110.
31. Nava ZQ, Obando C, Bracamonte M, Sousa A. Evaluación de la eficacia de la prueba de inmunodifusión en gel agar para la detección de anticuerpos contra el virus de la leucosis bovina. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. 2012;53(1):21-27.
 32. Ochoa UG, Deuces LP, Martínez BMR, Jiménez RM, Pérez R. Aislamiento de agentes bacterianos a partir de exudados nasales en rebaños ovinos trashumantes de Xalatlaco México. *Memorias de XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*; 1996 octubre 21-25; Campo Grande, (Brasil). Campo Grande: PANVET, 1996:186-190.
 33. Ordoñez II, Martínez S, Martínez AP. Evaluación de la incidencia de brucelosis en ganado ovino, caprino y bovino en México (2017-2019). *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*. 2021;7(14):1-5.
 34. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Aborto enzoótico de las ovejas (Clamidirosis ovina). *Manual terrestre de la OIE*. 2008.
 35. Ortega JL, Martínez A, García C, Rodríguez R. Seroprevalencia de brucelosis caprina en el municipio de Tlahualilo, Durango. *REDVET Revista Electrónica Veterinaria*. 2009;10(4):80-92.
 36. Padilla CG, Montoya YOI. Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella*. *Revista peruana de medicina y salud* 2003;20(2):118-124.
 37. Palomares, EG, Mejía SP, De la Cruz CL, Jiménez SH, Leyva CJS, Morales PMI, Díaz EA. Frecuencia y factores de riesgo asociados a la presencia de *Chlamydia abortus* en rebaños ovinos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2020;11(3):789-794.
 38. Pavan ME, Robles C, Cairó FM, Marcellino R, Pettinari MJ. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase b-subunit gene (rpoB). *Research in Veterinary Science*. 2012;92(2):202-6.

39. Peña SD, Posadas EM. Enfermedades sistémicas e intoxicaciones en el ganado bovino y animales de compañía. Universidad Autónoma Metropolitana. 2018.
40. Ríos DI. Clamidiasis en cabras. Universidad Autónoma Agraria. 2011.
41. Romero A, Quintero C, Marinho P. Meningoencefalitis trombótica (TME) por *Histophilus somni*. VETERINARIA (Montevideo) 2013;49:38-47.
42. Sánchez AR, Arteaga MA. Brucelosis: Un problema de salud no reportado en Hidalgo. TEPEXI Boletín Científico de la Escuela Superior Tepeji del Rio. 2019;12:34-37.
43. Sánchez BR. Determinación de géneros parasitarios gastrointestinales en ovinos con manejo extensivo en cuatro unidades de producción ovina, en dos comunidades del municipio de Joquicingo, Estado de México (tesis de maestría). Estado de México. Universidad autónoma del Estado de México. 2017.
44. Sánchez RL, Arellano RB, Hernández CR, Palomares RG, Barradas PF, Díaz EA. Presence of *Chlamydia abortus* in goats with a history of abortions in Mexico. Abanico veterinario. 2021;11:1-14.
45. Sandal IA, Inzana TI. A genomic window into the virulence of *Histophilus somni*. Trends in microbiology 2010;32:90-99.
46. Serrato AD, Flores LR, Aportela JC, Sierra EP. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología. 2017;53-73.
47. Servicio agrícola y ganadero (SAG). Aborto enzoótico ovino (AEO) en Chile, implementación de técnicas de laboratorio. Ministerio de agricultura, Chile. 2014.
48. Servicio agrícola y ganadero (SAG). Brucelosis caprina y ovina: *Brucella melitensis*. Ficha técnica. Ministerio de agricultura, Chile. 2016.
49. Sunagar R, Deore SN, Deshpande PV, Rizwan A, Sannejal AD, Sundareshtan S, Rawool DB, Barbuddhe SB et al. Differentiation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermis* by PCR for the

- fibrinogen binding protein gene. American Dairy Science Association. 2013;96:1-9.
50. Teankum, K., Pospischil, A., Janett, F., Brugnera, E., Hoelzle, L.E., Hoelzle, K., et al. Prevalence of *Chlamydia* in semen and genital tracts of bulls, rams, and bucks. *Theriogenology*, 2007;67:303-310.
51. Trezeguet MH, Nicola AR, Franco CZ. Manual de diagnóstico de *Brucella ovis*. España: SENSASA. 2015.
52. Velázquez OV, Valladares CB, Fresan AM, Melo GL, Gil GA. Distribución de la mastitis subclínica en rebaños ovinos de carne en unidades de producción familiar del Estado de México. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*. 2015;2(2):148-154.
53. Xavier MH, Silva TO, Costa ER, Mouscas VG, Santos RH. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Veterinary embryology*. 2010; 23:158-164.

12. ANEXOS

Anexo 1. Método de extracción de ADN por estuche comercial

El método de extracción consiste en agregar 200 µl de muestra a un tubo Eppendorf junto con 200 µl de *Biofluid & cell buffer* y 20 µl de proteinasa K. Mezclar cuidadosamente e incubar el tubo a 55°C por 10 min. Añadir 1 volumen de *Genomic binding buffer* a la muestra y mezclar. Trasladar la muestra a un tubo colector, centrifugar por 1 min, desechar el tubo colector junto con el líquido filtrado. Añadir 400 µl de *DNA pre-wash* en un nuevo tubo colector y centrifugar por 1 minuto, vaciar nuevamente. Añadir 700 µl de *g-DNA wash buffer* y centrifugar 1 min, desechar el líquido con la muestra. Transferir a un nuevo tubo Eppendorf y añadir >50 µl de *DNA elution buffer* (min. 35 µl), incubar 5 min y luego centrifugar 1 min.

Anexo 2. Método de extracción de ADN por fenol-cloroformo

Se centrifugan 300 µl de muestra a 3000 rpm por 15 min, se decanta la SSF cuidadosamente, posteriormente se resuspende el pellet en 500 µl de solución 1, adicionar 5 µl de lisozima y dejar a 39°C durante toda la noche, posteriormente agitar y agregar 100 µl de solución STEP, agregar 1.5 µl de proteinasa K, mezclar bien y calentar a 50-60°C por 1 hora, agitar ocasionalmente hasta aclarar agregar 1 volumen de fenol bufferado y agitar 5 min para emulsionar (vigorosamente) centrifugar a 3500rpm por 15 min (o en eppendorf 10,000 rpm), separar la fase acuosa y pasar a otro tubo, agregar 750 µl de acetato de potasio y mezclar, después se agrega dos volúmenes de etanol absoluto y mezclar, decantar el alcohol y agregar 50 µl de TE 10:1 para disolver y agregar 5ml de cloroformo y emulsificar, después centrifugar a 10,000 rpm por 15 min para separar las fases, se pasa la fase acuosa a otro tubo y se adiciona 1.5 ml de acetato de potasio y agitar. Se agrega 10 ml de etanol y mezclar para precipitar el ADN, finalmente disolver el ADN en 2 ml de TE 1 :10 pasar a un vial y congelar a -20°C.

Anexo 3. Método de sonicación

Cultivar cepas de *C. pseudotuberculosis* en agar sangre por 48 horas en oxígeno y cosechar para resuspender células en 10 ml de agua destilada estéril, inactivar colocando el tubo en baño María a 60°C durante 30 min, sonicar dando 30 seg de trabajo y 30 seg de descanso, repetir 10 veces el ciclo y uno último con duración de 1 minuto sin descanso. Posteriormente alícuotar la suspensión sonicada en tubos Eppendorf de 1.5 ml colocando aproximadamente 1 ml en cada uno. Centrifugar todos los tubos 6000 rpm durante 10 minutos y pasar el sobrenadante a otro tubo Eppendorf, centrifugar nuevamente el sobrenadante a 8000 rpm durante 30 minutos y finalmente separar el sobrenadante y hacer alícuotas en tubos Eppendorf limpios de 0.6 ml, esto se usará como antígeno.

Anexo 4. Preparación del gel de agarosa para IDGA

Preparación de soluciones:

1. Buffer de boratos 0.03 (pH 8.3): ácido bórico 0.19g, cloruro de potasio 0.72g, agua destilada 95ml. Disolver y ajustar el pH a 8.3 con NaOH (0.2 N) y aforar con H₂O destilada a 100 ml, conservar a 4°C.

2.- Gel agarosa boratos: agarosa 0.9 g, buffer de boratos 5 ml, suero hipersalino al 11% 95 ml.

Calentar el agua, añadir azida de sodio (0.1%) y la agarosa agitando; calentar en baño María o en microondas entre 70 y 80°C hasta que quede transparente y sin grumos (fundida). Se sirve el gel agarosa-boratos en la caja de Petri (10 ml/caja o la cantidad que proporcione un espesor de 3 a 4 mm). La cantidad de gel preparado es suficiente para 9 o 10 placas (10 ml/placa). Dejar gelificar durante 15 minutos a temperatura ambiente y esperar 24 horas antes de emplearlas. Se hacen pocillos en forma de rosetas (7 rosetas por caja) cada una debe de tener 6 pocillos y uno central. El diámetro de los pozos y la separación de estos será de 3 mm; la profundidad será entre 3 y 4 mm. Las placas se almacenarán en refrigeración de 2 a 8° y en cámara húmeda sellada hasta por 15 días.