

## ENFERMEDADES ABORTIVAS DE LOS BOVINOS: UN PROBLEMA ECONÓMICO Y DE SALUD EN OAXACA<sup>1</sup>

### ABORTIVE DISEASES OF CATTLE: AN ECONOMIC AND HEALTH PROBLEM IN OAXACA

Ericel Hernández García<sup>2</sup>, Jorge Morín Rubio y Jorge González Alcántara<sup>3</sup>

Facultad de Ciencias Químicas /Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca  
México

#### RESUMEN

Las enfermedades reproductivas en los bovinos dificultan o impiden la fecundación, el mantenimiento de una gestación completa o descendencia con posibilidades reales de sobrevivir. Estas enfermedades pasan inadvertidas la mayoría de las veces, debido a que generalmente se hacen evidentes cuando se presentan los abortos, aunque existen otros síntomas menores no visibles directamente como la mortalidad embrionaria, retención de la placenta, vaginitis e infertilidad, por mencionar algunos, situación que implica un incremento en la inversión por la compra de medicamentos, uso de personal, consumo de alimentos, pérdida de la cría, disminución de la producción. Además, algunas de las enfermedades reproductoras de los bovinos pueden ser zoonóticas, afectando por tanto a la salud humana. En Oaxaca, las enfermedades de mayor prevalencia asociadas a problemas reproductivos de los bovinos son la diarrea viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina y neosporosis que afectan solo al ganado, además de la brucelosis y leptospirosis que son zoonóticas; pudiendo un animal ser seropositivo a más de una de ellas. En el presente artículo se describe una metodología en la cual se estiman las prevalencias de brucelosis, leptospirosis, VDVB y neosporosis mediante las técnicas moleculares de PCR punto final y PCR en tiempo real. Se encontró que los cuatro agentes analizados en el presente estudio (VDVB, Neospora caninum, Brucella spp. y Leptospira spp.) cocirculan en las regiones de los Valles Centrales y de la Costa de Oaxaca. El principal agente causal de enfermedades abortivas es la bacteria Brucella spp., el protozoo Neospora caninum y el VDVB también están presentes y contribuyen al SAB, mientras que la bacteria Leptospira spp. no representa un factor de riesgo comparado con los otros 3 patógenos estudiados. Se contrastan y explican los resultados en relación a la prevalencia encontrada en otros estudios.

#### ABSTRACT

Reproductive diseases in cattle obstruct or prevent fertilization, the maintaining of a full gestation or offspring with a real chance of keeping alive. These kind of diseases are not taken into account most of the time, due to they usually become evident when abortions occur, although there are other minor symptoms not directly visible such as embryonic mortality, placenta retention, vaginitis and infertility, among others, situations that imply an increase in investment for the purchase of medicine, use of staff, food consumption, loss of breeding, decrease in production. In addition, some of the reproductive diseases of cattle can be zoonotic, thus affecting human health. In Oaxaca, the most prevalent diseases associated with reproductive problems in cattle are bovine viral diarrhoea, infectious bovine rhinotracheitis and neosporosis that only affects cattle, besides brucellosis and leptospirosis that are zoonotic; in addition, an animal can be seropositive for more than one pathogen. This article describes a methodology through which we estimate the prevalence of brucellosis, leptospirosis, bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and neosporosis through the molecular techniques of PCR final point and PCR in real time. We found that the four agents analyzed in this study (BVDV, Neospora caninum, Brucella spp and Leptospira spp.) co-circulate in the regions of the Central Valleys and the Coast of Oaxaca. The main causal agent of abortion is the bacterium Brucella spp., the protozoan Neospora caninum and the BVDV are also present and contribute to cattle abortion, while the bacterium Leptospira spp. does not represent a risk factor compared with the other 3 pathogens studied. The results are compared and explained in relation to the prevalence found in other studies.

#### PALABRAS CLAVE

Abortos, Zoonosis, Bovinos, Seropositivo, Prevalencia.

#### KEYWORDS

Abortions, Zoonosis, Cattle, Seropositive, Prevalence.

<sup>1</sup> Recibido el 23 de marzo y aceptado el 10 de junio del 2016.

<sup>2</sup> E-mail: ericledimp@gmail.com; gonzalezaj1@hotmail.com

<sup>3</sup> Los autores agradecen al M.V.Z. Jorge Morín Rubio, por el financiamiento otorgado para la realización del presente proyecto, siendo entonces director de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así como por permitir utilizar el Laboratorio de Genética Aplicada y Biología Molecular de dicha Facultad. A Félix Jesús López Franco, por la donación de los primers utilizados en la amplificación de Brucella spp.

Los bovinos son frecuentemente víctimas de un amplio rango de problemas fisiológicos, metabólicos, ambientales e infecciosos; en el mejor de los casos, suponiendo que una vaca fértil sea inseminada por un toro fértil o por un técnico con amplia experiencia en inseminaciones artificiales, la probabilidad de obtener un producto viable es de aproximadamente 60-70% (BonDurant, 2007). Uno de los principales factores de esta baja tasa de producción en todos los países ganaderos es el aborto bovino, donde los casos esporádicos y las epidemias de abortos son un problema de gran importancia que impacta profundamente en la productividad del ganado al reducir el número potencial de vaquillas de reemplazo y la producción de leche o carne, además de incrementar los costos asociados con la alimentación, tratamientos, inseminación y desecho prematuro de animales (Gädicke y Monti, 2008).

Las enfermedades abortivas del ganado bovino generalmente pasan desapercibidas para los productores y solo se hacen evidentes cuando se reportan casos específicos; sin embargo, se presentan otras pérdidas menores evidentes como mortalidad embrionaria, retención de placenta, endometritis, metritis, vaginitis, infección en toros, falla en la fertilidad, entre otros trastornos inflamatorios (BonDurant, 2007; Bronner et al., 2015; Huamán, Rivera, Araínga, Gavidia y Manchego, 2007). Concretamente, Rothman (2002) menciona que un síndrome es un conjunto de fenómenos que caracterizan una situación determinada, por lo que el Síndrome del Aborto Bovino (SAB) requiere de múltiples factores causales, que pueden actuar de manera independiente o interactuar entre ellos.

El SAB tiene múltiples etiologías, siendo los principales agentes infecciosos: virus, bacterias, protozoarios y hongos (Bronner et al., 2015; Escamilla, Martínez, Medina y Morales, 2007; Rivera, Benito, Ramos y Manchego, 2004). Para identificar esos patógenos las pruebas serológicas son las utilizadas principalmente, pero sus resultados deben ser cuidadosamente interpretados debido a que es difícil diferenciar entre anticuerpos debidos a vacunación y los anticuerpos producidos por una infección natural, además las pruebas serológicas presentan sensibilidades y especificidades menores al 80% por lo que pueden existir falsos positivos y negativos debido a las reacciones cruzadas o la

baja cantidad de patógenos presentes en el bovino al momento de la toma de la muestra (Bronner et al., 2015; Escamilla et al., 2007; Meléndez-Soto et al., 2010).

En México, poco es conocido de la epidemiología de las enfermedades abortivas en el ganado debido a los escasos estudios que existen o al diagnóstico ineficiente de las pruebas serológicas que no arrojan resultados confiables, por lo que no hay datos precisos acerca de los principales agentes causales del SAB que son principalmente el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), las bacterias *Leptospira* spp., *Brucella* spp. y el protozooario *Neospora caninum*, ya que entre ellas rebasan el 80% de casos diagnosticados (Escamilla et al., 2007; Mondragón-Zavala, Cruz-Vázquez, Medina-Esparza, Ramos-Parra y García-Vázquez, 2011; Romero-Salas et al., 2010).

## BRUCELOSIS

La brucelosis es una enfermedad de origen bacteriano que afecta a seres humanos y diferentes especies de animales domésticos y mamíferos marinos (Kanik-Yüksek, Gülan, Ozkaya-Parlakay y Tezer, 2014; Morales-García et al., 2015). Está distribuida por todo el mundo y es un problema fuerte de salud pública en países del Mediterráneo, oeste de Asia, algunas regiones de África y países de Latinoamérica como Colombia, Venezuela, Brasil, Perú, Argentina y en México es considerada una enfermedad enzoótica (Cervera-Hernández et al., 2016; Keleher y Skyberg, 2016; Morales-García et al., 2015). Las especies zootécnicas más afectadas son bovinos, cabras y cerdos, aunque también la pueden presentar otros, como los perros (Córdova-Izquierdo et al., 2007; Oseguera-Montiel, Frankena, Udo, Keilbach-Baer y Van der Zijpp, 2013). Dicha enfermedad es causada por diferentes especies del género *Brucella*, las más importantes para los animales domésticos y el humano son *Brucella melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* (Cervera-Hernández et al., 2016). Los animales seropositivos tienen mayores tasas de aborto, muerte fetal, infertilidad y mortalidad de terneros, además de presentar menor producción de leche y mayores intervalos entre partos; en los machos causa orquitis (Aznar, Samartino, Humblet y Saegerman, 2014; Keleher y Skyberg, 2016).

El contagio al hombre ocurre por contacto directo con animales infectados, a través de heridas o por ingestión de productos y/o derivados contaminados (Aznar et al., 2014; Morales-García et al., 2015). La brucelosis humana causa fiebre, sudor maloliente, hepatomegalia y esplenomegalia, así también epididimitis y orquitis en algunas ocasiones en los hombres (Cervera-Hernández et al., 2016; Kanik-Yüksek et al., 2014; Keleher y Skyberg, 2016).

Pocos estudios se han hecho en México para el diagnóstico de la brucelosis tanto humana como de los animales, la gran mayoría de ellos fueron realizados con métodos serológicos. Hernández-García (2009) estudió 210 bovinos provenientes de la región de la Costa en el estado de Oaxaca, obteniendo un total de 29 animales positivos (14%) mediante PCR en Tiempo Real y solo 21 (10%) con la prueba serológica de la tarjeta. También, Córdoba-Izquierdo et al. (2007) reportaron un total de 37 animales seropositivos (14%) de un total de 267 en el estado de Campeche utilizando el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Meléndez-Soto et al. (2010) estudiaron un total de 105 vacas lecheras con antecedentes de aborto del estado de Aguascalientes usando el método ELISA, a partir del cual obtuvieron solo 5 animales positivos (5%). Así mismo, Oseguera-Montiel et al. (2013) analizaron 1713 cabras provenientes de los estados de Jalisco y Michoacán, de las cuales un total de 691 (38%) resultaron positivas a brucelosis con las pruebas de la tarjeta y de fijación del complemento. Morales-García et al. (2015) realizaron un estudio donde trabajaron con 300 vacas, 336 cabras y 14 ganaderos del estado de Guanajuato, en el cual fueron encontradas positivas 40 vacas (13%), 34 cabras (10%) y los 14 ganaderos (100%), todas las pruebas se realizaron con el antígeno Rosa de Bengala y confirmadas por aislamiento en cultivo. Finalmente, Cervera-Hernández et al. (2016) evaluaron con pruebas serológicas un total de 331 sueros humanos de los cuales 60 resultaron positivos, los ensayos fueron realizados mediante la prueba de aglutinación en placa en sueros de pacientes del estado de Hidalgo.

## DIARREA VIRAL BOVINA (DVB)

La DVB es una enfermedad causada por un pestivirus llamado Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), tiene distribución mundial y es una enfermedad de alto impacto económico por su rápida difusión y por persistir en las unidades de producción sin ser descubierto, ya que no es una enfermedad zoonótica, por lo que no existen campañas de erradicación como en otras enfermedades (Córdova-Izquierdo et al., 2007; Meléndez-Soto et al., 2010; Wang, Deng, Huang y Chang, 2015). Afecta rumiantes domésticos y salvajes, con morbilidad del 80% y mortalidad del 20%. El VDVB tipo I causa una enfermedad ligera, pero en vacas preñadas las infecciones fetales pueden inducir abortos y otras patologías reproductivas. Por su parte, el VDVB tipo II está asociado principalmente a la enfermedad respiratoria severa y a un cuadro hemorrágico agudo, caracterizado por trombocitopenia, diarrea hemorrágica, epistaxis, petequias, equimosis en mucosas, anemia, sangrado en zonas de inyección, pirexia, leucopenia y muerte (Craig, König, Benitez y Draghi, 2015; Neil, Dubovi y Ridpath, 2015; Wang et al., 2015). Cabe señalar que la transmisión se lleva a cabo por aerosoles, fluidos nasales, contacto directo con agua o alimentos contaminados, heces, leche, inseminación artificial, transferencia de embriones, vacunas y palpación rectal (Araínga, Manchego, Rivera y Huamán, 2010; Craig et al., 2015; Motta, Waltero y Abeledo, 2013). El impacto más relevante que tiene el virus en la reproducción se da cuando una hembra preñada se infecta con una cepa no citopática, la que dependiendo del momento de la gestación puede producir muerte embrionaria, momificación, aborto, efectos teratogénicos y nacimiento de terneros débiles o inmunotolerantes con infección persistente de por vida (persistentemente infectados), lo cual representa un problema fuerte para el diagnóstico de VDVB por métodos serológicos, ya que estos animales no generan anticuerpos contra el virus y por lo tanto son detectados como negativos (Córdova-Izquierdo et al., 2007; Craig et al., 2015; Neil et al., 2015).

El VDVB es un virus de importancia económica del ganado endémico en la mayoría de las poblaciones bovinas (Araínga et al., 2010; Motta et al., 2013). Se considera una prevalencia mundial del VDVB del

60 al 85% y de 1 al 2% en animales persistentemente infectados (Confer, Fulton, Step, Johnson y Ridpath, 2005; Quispe, Cama, Rivera y Araínga, 2008).

En lo correspondiente a este virus, en Yucatán se realizó un estudio (Solís-Calderon, Segura-Correa, V. y Segura-Correa, J., 2005) que abarcó un total de 560 bovinos a los cuales se les diagnosticó VDVB, obteniendo un total de 78 animales positivos. Córdova-Izquierdo et al. (2007) obtuvieron un total de 33 animales positivos a VDVB (13%) en una investigación llevada a cabo en Campeche y en la cual también detectaron brucelosis y leptospirosis con ELISA. Análogamente, Meléndez-Soto et al. (2010) en una indagación de 110 vacas lecheras con antecedentes de abortos del estado de Aguascalientes, detectaron 95 animales seropositivos (86%) con el método ya mencionado. Además, Ramos (2014) estudió la prevalencia de VDVB con métodos serológicos en bovinos de San Juan Cotzocón, Mixe, Oaxaca; obteniendo 420 animales positivos de 1031 muestreados (41%).

## LEPTOSPIROSIS

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana que afecta a mamíferos domésticos y de vida libre, así como al hombre, siendo por tanto una zoonosis. En los bovinos ocasiona infertilidad, abortos, mortinatos, terneros débiles al nacimiento y disminución temporal de la producción de leche; mientras que en los humanos se manifiesta principalmente como fiebre indiferenciada, por lo que es difícil diferenciarla de otras enfermedades febriles, puede causar también fallas renales y síndrome hemorrágico pulmonar (Allan et al., 2015). Aunque existen más de 230 serovariedades de *Leptospira interrogans sensu lato*, las infecciones están causadas por aquéllas que son endémicas en cada región y su presencia está relacionada a factores ecológicos como alta temperatura y humedad, que permiten que la bacteria sobreviva en el ambiente favoreciendo la transmisión (Córdova-Izquierdo et al., 2007), como ocurre en algunas regiones del Estado de Oaxaca. Esta enfermedad es común en áreas tropicales donde los humanos y los animales conviven y tienen contacto muy cercano o directo.

## NEOSPOROSIS

La neosporosis es una enfermedad de distribución mundial causada por el protozooario *Neospora caninum* que afecta a varias especies como rumiantes, perros y caballos (Martínez-Contreras, Moreno-Figueroa y Cruz-Carrillo, 2012; Sánchez, Morales, Martínez y Trigo, 2002). Este protozooario es una de las causas principales de SAB en ganado lechero incluso en países del primer mundo como Estados Unidos, Nueva Zelanda, Holanda, Reino Unido, entre otros (Dubey, Schares y Ortega-Mora, 2007; Martínez-Contreras et al., 2012). La característica principal de esta enfermedad es el aborto, aunque pueden nacer terneros con graves lesiones cerebrales o terneros con apariencia normal pero infectados congénitamente a los cuáles se les denomina persistentemente infectados (Dubey, 2003). El aborto se puede presentar en vacas de cualquier edad, el cual sucede en cualquier etapa de la preñez, pero generalmente ocurre entre el cuarto y el quinto mes de gestación (Martínez, 2013). La neosporosis fue reportada en 1984 en perros con miositis, miocarditis y encefalomiелitis pero descrito como *Neospora caninum* hasta 1988, los perros se infectan al alimentarse con tejidos como la placenta o fetos abortados conteniendo quistes del parásito (Meléndez-Soto et al., 2010). El perro es el hospedero definitivo y excreta los quistes en sus heces que pueden contaminar el agua y alimentos de las vacas (Martínez-Contreras et al., 2012). Las vacas entonces se infectan por vía digestiva al ingerir alimento contaminado con quistes y no muestra signos clínicos, excepto, la pérdida del feto (Meléndez-Soto et al., 2010).

Al respecto, Sánchez et al. (2003) estudiaron perros y bovinos en Tizayuca, Hidalgo, observando que la presencia de los primeros es un factor importante, ya que en los hatos donde había presencia de estos animales la frecuencia de neosporosis fue mayor (58%) que la frecuencia encontrada en hatos donde no había perros (35%). De manera similar, Salinas-Meléndez et al. (2011) estudiaron bovinos del estado de Nuevo León encontrando una frecuencia de 45% mediante un kit comercial serológico. Mondragón-Zavala et al. (2011) analizaron neosporosis en ganado de carne y encontraron una

prevalencia del 23% mientras que Meléndez-Soto et al. (2010) en un 55%. Por lo que la enfermedad generalmente está presente en el ganado bovino.

Debido a que las enfermedades abortivas no han sido bien estudiadas en el país y particularmente en el estado de Oaxaca, además de que los estudios reportados han sido realizados principalmente con pruebas de diagnóstico serológicas, que como se ha mencionado no son lo suficientemente sensibles y específicas comparadas con las pruebas moleculares, a continuación se describe una metodología en la cual se estiman las prevalencias de brucelosis, leptospirosis, VDVB y neosporosis mediante las técnicas moleculares de PCR punto final y PCR en tiempo real.

---

## MÉTODO

### COLECTA DE LAS MUESTRAS

Se colectaron un total de 211 muestras de bovinos de doble propósito pertenecientes a un total de 18 hatos distribuidos en todo el distrito de Tlacolula en la región oaxaqueña de Valles Centrales y del municipio de San Sebastián Ixcapa en la región de la Costa; se incluyeron para el estudio los animales en etapa reproductiva y con antecedentes de problemas reproductivos, así como hatos cuyo ganadero tenía interés en conocer la situación de su ganado. Las muestras de sangre fueron tomadas a partir de la vena caudal en tubos Vacutainer sin anticoagulante para que se pudiera separar la fase celular del suero, el cual fue alicuotado en tubos Eppendorf de 1.5 ml y congelado a -20°C hasta su utilización.

### EXTRACCIÓN DEL ADN DE *Brucella* spp., *Leptospira* spp. Y *Neospora caninum*

Para la extracción del ADN de *Neospora caninum*, *Brucella* spp. y *Leptospira* spp. se utilizó el kit QIAamp® DNA Mini (QIAGEN), siguiendo las condiciones establecidas por el proveedor que a continuación se describen: previo a la extracción se descongelaron las muestras y se dejaron



reposando hasta que llegaran a temperatura ambiente; se agregaron 20 µL de proteinasa K a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le añadieron 200 µL del suero y 200 µL de buffer AL los cuales fueron mezclados por aplicación de vórtex durante 15 s o hasta observar una mezcla homogénea y se incubó a 56 °C durante 10 min; luego se añadieron 200 µL de etanol absoluto y nuevamente se mezcló por vórtex durante 15 s; la mezcla fue transferida a una columna QIAmp con un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min, la columna fue entonces transferida a un tubo colector nuevo (el primer tubo colector fue desechado con el primer filtrado) y se agregaron 500 µL de buffer AW1, después se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min; posteriormente fueron añadidos a la columna 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó a 14000 rpm durante 3 min; la columna fue transferida a un tubo nuevo de 1.5 mL y el tubo colector fue desechado, se agregaron 200 µL de buffer AE y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para favorecer la unión del ADN secuestrado en la columna al buffer AE, finalmente se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min y el volumen de buffer AE (con el ADN) obtenido fue almacenado a -20°C hasta su uso. Dado que el kit extrae ADN total, solo fue necesaria la obtención de solo un extracto de ADN obtenido de cada muestra, a partir del cual se puede diagnosticar cualquiera de los parásitos a estudiar, siempre y cuando su material genético sea de ADN, como es el caso de las bacterias *Brucella* spp. y *Leptospira* spp. y el protozooario *Neospora caninum*.

## EXTRACCIÓN DEL ARN DEL VDVB

El kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN) fue utilizado para la extracción del ARN viral del VDVB, las condiciones establecidas por el proveedor fueron utilizadas y a continuación se describen: previo a la extracción del ARN viral, las muestras se descongelaron y se esperó hasta que llegaran a temperatura ambiente; en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se añadieron 560 µL de buffer AVL conteniendo acarreador de ARN (5.6 µL de acarreador y 554.4 µL de buffer AVL) y 140 µL del suero de las muestras y se mezcló en vórtex por 15 s o hasta observar una mezcla homogénea, luego se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se añadieron 560 µL de etanol absoluto mezclando nuevamente en vórtex

durante 15 s; de la mezcla se pipetearon primero 630  $\mu$ L a una columna QIAamp mini con tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min, se desechó el sobrenadante y el resto de la mezcla fue aplicada a la columna para nuevamente centrifugar a 8000 rpm durante 1 min, la columna fue colocada en un tubo colector nuevo y el otro fue desechado; enseguida se añadieron 500  $\mu$ L de buffer AW1 a la columna y se centrifugó a 8000 rpm por un 1 min, el tubo colector fue desechado y la columna transferida a un nuevo tubo colector, entonces se le agregaron 500  $\mu$ L de buffer AW2 y se centrifugó a 14000 rpm durante 3 min; la columna fue transferida a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le agregaron 60  $\mu$ L de buffer AVE, dejándose incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir que el ARN secuestrado en la columna fuera diluido en el buffer AVE, finalmente se centrifugó a 8000 rpm por 1 min y el volumen obtenido de buffer AVE con el ARN diluido fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR PCR EN TIEMPO REAL DE LEPTOSPIRA SPP., NEOSPORACANINUM Y VDVB

Para el diagnóstico molecular de VDVB por PCR en tiempo real se utilizó el kit Virotype® BVDV RT-PCR (QIAGEN) utilizando las condiciones establecidas por el proveedor. A un tubo para PCR de 200  $\mu$ L se añadieron 19.75  $\mu$ L de solución PCR mix y 0.25  $\mu$ L de solución *Enzyme mix*, luego se añadieron 5  $\mu$ L de la muestra para totalizar un volumen de reacción de 25  $\mu$ L; para el control positivo de la reacción se añadieron 5  $\mu$ L de la solución *Positive Control* (control positivo) en lugar de la muestra y para el control negativo se adicionaron 5  $\mu$ L de solución *Negative Control* (control negativo). Las reacciones fueron colocadas en el termociclador *LineGene K* (BIOER) y las condiciones estándar del proveedor fueron utilizadas, por lo que se seleccionaron los canales FAM para BVDV, HEX para el control interno de reacción y TAMRA para el apagador. La amplificación del VDVB se llevó a cabo inicialmente a una temperatura de 50°C por 20 min para la retrotranscripción, seguido por 15 min a 95°C y 40 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 57 °C por 45 s y extensión a 68 °C por 45 s, tomándose la lectura de la fluorescencia al final de cada ciclo.

Para identificar al protozoario *Neospora caninum* se utilizó el kit cador N. caninum PCR Reagent siguiendo las especificaciones del proveedor. En un tubo para PCR de 200 µL se agregaron 5 µL de 5X Pathogen Master Mix, 2.5 µL de sondas/primers, 2.5 µL de Internal Control Assay, 2.5 µL de Internal Control DNA, 7.5 µL de agua destilada estéril y 5 µL de la extracción de ADN o 5 µL de ADN control de *Neospora caninum* para el control positivo o 5 µL de agua destilada estéril para el control negativo. Para la corrida de PCR se seleccionaron los canales verde y amarillo en el termociclador LineGene K (BIOER) y se utilizaron las siguientes temperaturas: 95 °C 5 min, 40 ciclos con temperatura a 95 °C 15 s y 60 °C por 30 s, registrándose la fluorescencia al final de cada ciclo

El kit cador *Leptospira* PCR Reagent (QIAGEN) fue utilizado para el diagnóstico de leptopirosis, las condiciones establecidas por el proveedor fueron usadas en la reacción. El procedimiento para preparar la reacción así como la condiciones de corrida de la PCR en el termociclador es el mismo que para *Neospora caninum* excepto que para el control positivo de reacción se añade ADN estándar de *Leptospira* spp.

### DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR PCR DE PUNTO FINAL DE BRUCELLA SPP

Para el diagnóstico molecular de *Brucella* spp. se utilizó la técnica establecida por Baily, Krahn, Drasar y Stoker (1992) cuyos cebadores (primers) producen un producto de amplificación del gen del antígeno de 31 kDa de *Brucella abortus* de 219 pares de bases. Para la reacción se agregaron 0.5 µL del cebador sentido y 0.5 µL del cebador antisentido, 10 µL de Taq DNA polymerase Master Mix (Ampliqon), 6 µL de agua destilada estéril y 3 µL de muestra; para el control positivo se agregaron 3 µL de ADN control y para el control negativo de reacción se agregaron 3 µL de agua destilada estéril, en lugar de la muestra. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C 2 min, seguida por 40 ciclos a 94 °C 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 30 s. Para la detección de brucelosis se utilizó el termociclador de punto final *Trinity* (Kyratec) ya que no se cuenta con el kit para detección de brucelosis por PCR en tiempo real.

## RESULTADOS

El programa LineGene9600 plus del PCR en tiempo real LineGene K correlaciona los niveles de fluorescencia emitidos por una muestra positiva contra el control interno de reacción, con lo cual establece una fluorescencia mínima para determinar una muestra como positiva que es denominada umbral o *threshold*, por lo que todas las muestras que rebasaron ese umbral establecido en 100 unidades de fluorescencia fueron consideradas positivas (Figura 1). El PCR en tiempo real es un método 100% sensible y específico ya que la sonda *Taqman* (de hidrólisis) solo emite fluorescencia cuando está presente el material genético del organismo a identificar, por lo que no existen resultados falsos negativos ni falsos positivos.

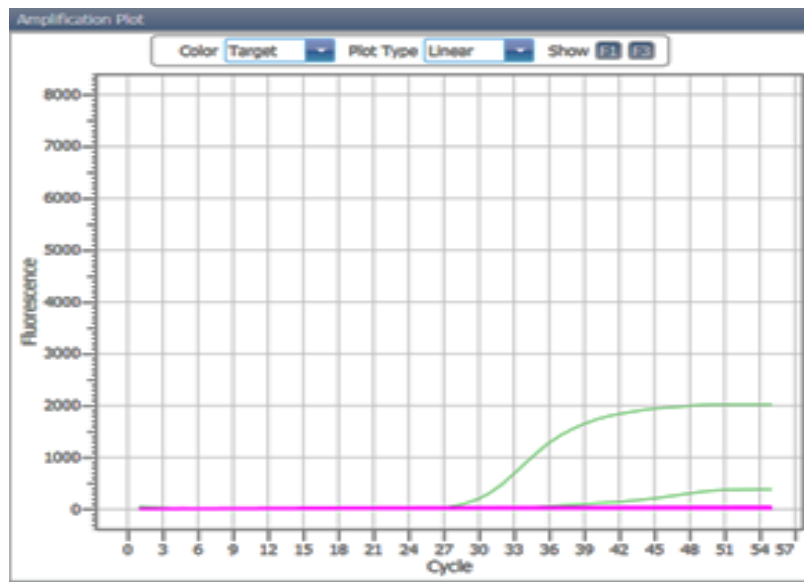


Figura 1. Cinética de la reacción de amplificación del control negativo (línea rosa), control positivo (línea verde superior) y una muestra (línea verde inferior) para el VDVB.

Para el caso del diagnóstico de brucelosis, se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa para observar el amplicón de 219 pares de bases que determina como positiva la prueba (Figura 2).

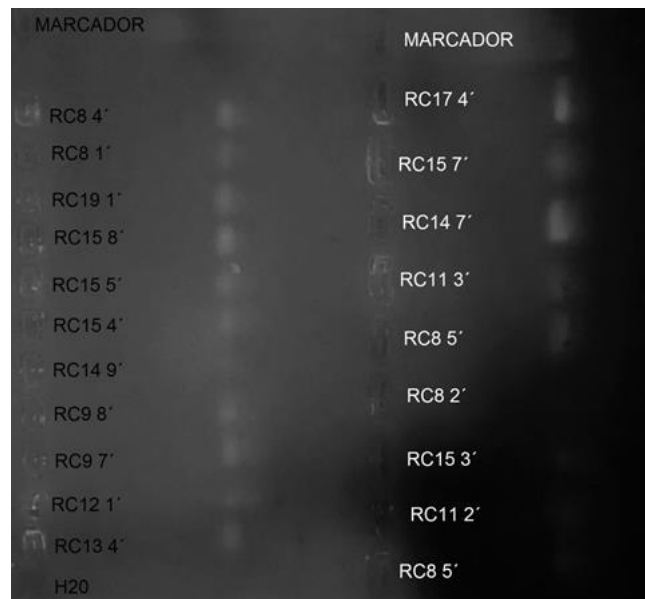


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, las muestras positivas muestran un amplicón de 219 pb. Las muestras son identificadas con las iniciales RC (rancho), seguidas del número de rancho y el número de muestra con apóstrofe, H<sub>2</sub>O control negativo.

De un total de 156 muestras estudiadas mediante PCR en tiempo real con sondas *Taqman*, se obtuvieron un total de 26 (16.7%) animales positivos a *Neospora caninum*, 3 (1.9%) positivos a *Leptospira* spp., 23 (14.7%) positivos a VDVB; mientras que para *Brucella* spp. por medio de PCR punto final se detectaron un total de 52 (33.3%) animales positivos (Figura 3).

En estos resultados, fue interesante ver que 1 (0.7%) individuo presentó coinfección para *Neospora caninum* y VDVB, 10 animales presentaron coinfección con *Brucella* spp. y VDVB y 3 (1.9%) coinfección con *Brucella* spp. y *Neospora caninum*, no hubo ningún individuo que presentara a *Leptospira* spp. como agente coinfectante (Figura 3). Si los resultados se analizan de manera

individual, es decir si no se consideran las coinfecciones, los animales infectados con *Brucella* spp. fueron 65 (41.6%), con *Neospora caninum* 30 (19.2%), con VDVB se obtuvieron 34 (21.8%) y para *Leptospira* spp. solo 3 (1.9%) animales fueron positivos (Figura 3).

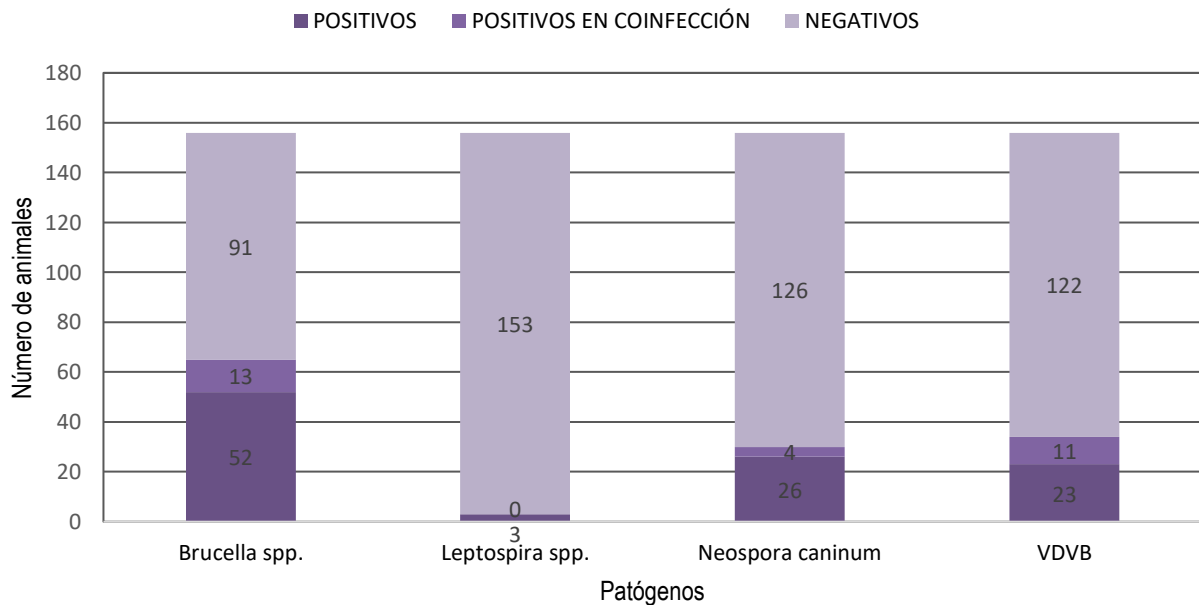


Figura 3. Frecuencia de animales positivos y negativos a *Brucella* spp., *Leptospira* spp., *Neospora caninum* y VDVB.

En suma, tomando como factor de SAB a los patógenos en general, el 76% (118) de los bovinos estudiados presentaron al menos uno de sus agentes causales (Figura 4) y 44% (68) de los animales infectados representan un posible problema de salud humana al estar infectados con un patógeno zoonótico (*Brucella* spp. y *Leptospira* spp.).

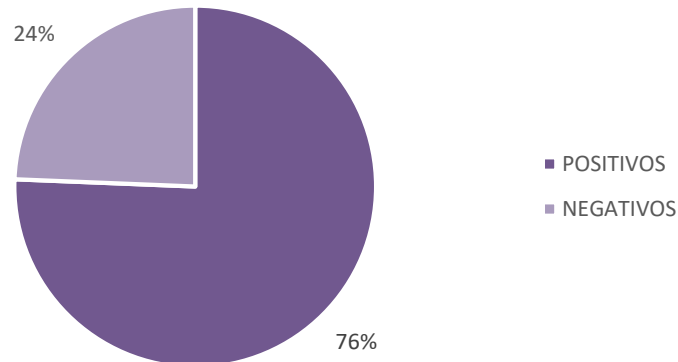


Figura 4. Porcentaje de animales positivos considerando cualquier agente infeccioso causante de SAB y porcentaje de animales negativos (no presentaron infección a ninguno de los patógenos estudiados).

Por otra parte, de los animales infectados con *Neospora caninum*, 21 habían presentado problemas reproductivos, 18 de los bovinos diagnosticados con VDVB habían tenido problemas abortivos, 31 de los diagnosticados con *Brucella* spp. y ninguno de los que fueron diagnosticados con *Leptospira* spp. presentaron historial clínico con problemas reproductivos (Figura 5). De los animales que presentaron coinfección, solo 5 de ellos tenían historial de problemas reproductivos y correspondieron todos a animales coinfectados con *Brucella* spp. y VDVB. Es importante mencionar que, en todos los hatos muestreados, hay presencia de perros, lo que es resulta fundamental considerando que los agentes causales mayoritariamente encontrados en el presente estudio fueron *Brucella* spp. y *Neospora caninum*, cuyos huéspedes alternativos (*Brucella* spp.) o principales (*Neospora caninum*) son precisamente los perros.

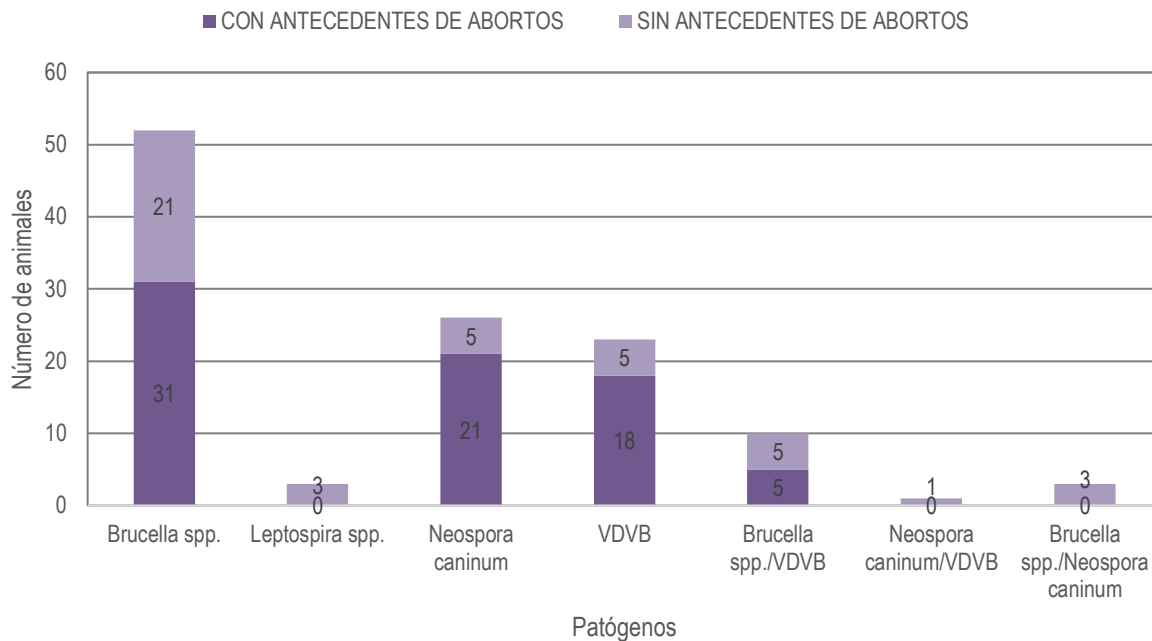


Figura 5. Frecuencia de los animales positivos con o sin antecedentes de abortos.

Es importante señalar que existen escasos estudios de estos agentes en el estado de Oaxaca, un estudio realizado por Ramos (2014) en el municipio de San Juan Cotzocón, Mixe, reveló que la prevalencia para VDVB fue de 41% mientras que para leptospirosis fue de 76%, lo que contrasta con este estudio, ya que la leptospirosis solo está presente en 1.9% y el VDVB en 21.8%; sin embargo el primer estudio fue realizado con pruebas serológicas que como ya se ha mencionado, presentan un alto porcentaje de error debido a su baja especificidad y sensibilidad, además de que es un municipio cercano a la colindancia con el estado de Veracruz, mientras que el presente estudio se realizó en las regiones de los Valles Centrales y la Costa de Oaxaca y la identificación de leptospirosis y VDVB se realizó con sondas *taqman*, el cual es el único método de diagnóstico 100% específico y sensible.

De igual manera, Escamilla et al. (2007) en Querétaro reportaron una seroprevalencia de VDVB de 70%, 91% para *Leptospira* spp., 64% para *Neospora caninum* y 24% para *Brucella* spp., notablemente



la leptospirosis fue el principal factor de SAB en dicho estudio, lo que contrasta con el presente estudio donde la brucelosis es el principal factor y la leptospirosis está escasamente representada. En Aguascalientes, Meléndez-Soto (2010) encontraron una seroprevalencia del 86% para VDVB, 55.5% para *Neospora caninum*, 54.5% para leptospirosis y 4.5% para brucelosis; es notable que tanto en el estudio de Querétaro como en el de Aguascalientes, *Brucella* spp. fue el patógeno encontrado en menor frecuencia y por lo tanto el que menos contribuyó al SAB, mientras que, en este estudio, la *Brucella* spp. es el principal factor causante de SAB y la *Leptospira* spp. aunque está presente, no es un factor de riesgo a la salud humana y animal, ni tampoco representa un impacto a la economía de los granjeros.

## DISCUSIÓN

---

Los cuatro agentes analizados en el presente estudio (VDVB, *Neospora caninum*, *Brucella* spp. y *Leptospira* spp.) cocirculan en las regiones de los Valles Centrales y de la Costa de Oaxaca. El principal agente causal de enfermedades abortivas es la bacteria *Brucella* spp., el protozoario *Neospora caninum* y el VDVB también están presentes y contribuyen al SAB, mientras que la bacteria *Leptospira* spp. no representa un factor de riesgo comparado con los otros 3 patógenos estudiados. Es importante mencionar que *Brucella* spp. es una bacteria zoonótica y por tanto tiene la capacidad de infectar al hombre, por lo que al estar en una frecuencia tan alta representa un factor de riesgo considerable para la salud humana.

Desde el punto de vista económico, la frecuencia de patógenos causantes de SAB es muy alta, por lo que claramente los abortos y demás problemas reproductivos y de producción en el ganado bovino de los Valles Centrales y la Costa de Oaxaca son provocados principalmente por *Brucella* spp., *Neospora caninum* y VDVB. Lo anterior implica no solamente posibles problemas de salud humana (por *Brucella*

spp.) sino también grandes pérdidas financieras para el sector pecuario, ya que la frecuencia conjunta de los patógenos estudiados es alta (76%).

Los presentes resultados contrastan con los obtenidos en otros estudios del país y particularmente en Oaxaca, puesto que generalmente los patógenos encontrados principalmente son el VDVB y *Leptospirosis* spp., como lo marca la literatura (Araínga et al., 2010; Confer et al., 2005; Meléndez-Soto et al., 2010; Motta et al., 2013; Quispe et al., 2008; Ramos, 2014); no obstante, aquí se encontró la *Brucella* spp. como factor principal de SAB, lo cual puede deberse a varios factores, tales como el hecho de que los demás estudios fueron realizados con pruebas serológicas que, como ya se ha mencionado, presentan baja sensibilidad y especificidad, porque los patógenos encontrados en baja frecuencia en este estudio apenas empiezan a distribuirse en las zonas de análisis o por las condiciones ambientales que no favorecen el desarrollo de esos patógenos, como sucede con *Brucella* spp. Hernández-García (2009) realizó un estudio de brucelosis en la Costa de Oaxaca y obtuvo una prevalencia del 14% de animales infectados, aquí se está reportando una prevalencia del 41.6%; aunque los resultados incluyen ganado de los Valles Centrales, la prevalencia obtenida es alta, por lo que se puede establecer que la brucelosis se está diseminando ampliamente en la región costeña. Es importante mencionar que este estudio se va a extender progresivamente a todo el estado, lo que permitirá conocer la situación actual y las implicaciones de las enfermedades abortivas en los ganados de cada una de las regiones en estudio

## REFERENCIAS

- Allan, K., Biggs, H., Halliday, J., Kazwala, R., Maro, V., Cleaveland, S. & Crump, J. (2015). Epidemiology of leptospirosis in Africa: A systematic review of a neglected zoonosis and a paradigm for “one health” in Africa. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 9 (9), e0003899.

- Araínga, M., Manchego, A., Rivera, H. & Huamán, J. (2010). Phenotype and genotype of bovine viral diarrhoea virus isolated in Peruvian cattle. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 21 (2), 192-203.
- Aznar, M., Samartino, L., Humblet, M. & Saegerman, C. (2014). Bovine brucellosis in Argentina and bordering countries: Update. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61 (2), 121-133.
- Baily, G., Krahn, J., Drasar, D. & Stoker, N. (1992). Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(4), 271-275.
- BonDurant, R. (2007). Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester. *Theriogenology*. 68, 461-473.
- Bronner, A., Morignat, E., Hénaux, V., Madouasse, A., Gay, E. & Calavas, D. (2015). Devising an indicator to detect mid-term abortions in dairy cattle: a first step towards syndromic surveillance of abortive diseases. *Plos ONE*, 10 (3), e0119012.
- Cervera-Hernández, M., Ordaz-Vázquez, A., Torres-González, P., Chávez-Mazari, B., Soberanis-Ramos, O., Sifuentes-Osornio, J., Ponce-de León, A. & Bobadilla-del Valle, M. (2016). Seroprevalence of brucellosis among dairy farm workers in Mexico. *Salud Pública Mexico*, 58, 366-370.
- Confer, A., Fulton, R., Step, D., Johnson, B. & Ridpath, J. (2005). Viral antigen distribution in the respiratory tract of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus subtype 2a. *Veterinary Pathology*, 42 (2), 192-199.
- Córdova-Izquierdo, A., Córdova-Jiménez, C., Córdova-Jiménez, M., Saltijeral-Oaxaca, J., Ruiz-Lang, C., Xolalpa-Campos, V., Cortés-Suárez, S. & Guerra-Liera, J. (2007). Seroprevalencia de enfermedades causantes de aborto bovino en el trópico húmedo mexicano. *Revista Veterinaria*, 18 (2), 139-142.
- Craig, M., König, G., Benitez, D. & Draghi, M. (2015). Molecular analyses detect natural coinfection of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) with bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) in serologically naive animals. *Revista Argentina de Microbiología*, 47 (2), 148-151.

- Dubey, J. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal of Parasitology*, 41 (1), 1-16.
- Dubey, J., Schares, G. & Ortega-Mora, L. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (2), 323-367.
- Escamilla, P., Martínez, J., Medina, M. & Morales, E. (2007). Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 71, 314-317.
- Gädicke, P. & Monti, G. (2008). Aspectos epidemiológicos y de análisis del síndrome de aborto bovino. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 40, 223-234.
- Hernández-García, E. (2009). *Prevalencia de brucelosis en hatos bovinos de Villa de Tututepec de Melchor Ocampo, Costa, Oaxaca comparando la prueba tamiz oficial con qPCR. (Tesis de Licenciatura)*. Oaxaca: Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca.
- Huamán, J., Rivera, H., Araínga, M., Gavidia, C. & Manchego, A. (2007). Bovine viral diarrhea and persistently infected animals in dairy herds in Majes, Arequipa. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 18(2), 141-149.
- Kanik-Yüksek, S., Gülhan, B., Ozkaya-Parlakay, A. & Tezer, H. (2014). A case of childhood brucellosis with neurological involvement and epididymo orchitis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8 (12), 1636-1638.
- Keleher, L. & Skyberg, J. (2016). Activation of bovine neutrophils by *Brucella* spp. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 177, 1-6.
- Martínez, P. (2013). Brucelosis humana: situación epidemiológica en Chile 2001-2010. *Revista Chilena de Infectología*, 30 (6), 653-659.
- Martínez-Contreras, A., Moreno-Figueroa, G. & Cruz-Carrillo, A. (2012). Actualización de la neosporosis bovina. *Conexión Agropecuaria*, 2, 49-66.
- Meléndez-Soto, R., Valdivia-Flores, A., Rangel-Muñoz, E., Díaz-Aparicio, E., Segura-Correa, J. & Guerrero-Barrera, A. (2010). Factores de riesgo asociados a la presencia de aborto y desempeño

- reproductivo en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1 (4), 391-401.
- Mondragón-Zavala, K., Cruz-Vázquez, C., Medina-Esparza, L., Ramos-Parra, M. & García-Vázquez, Z. (2011). *Neospora caninum* infection in beef cattle reared under grazing conditions in north central Mexico. *Revista MVZ Córdoba*. 16 (2), 2484-2490.
  - Morales-García, M., López-Méndez, J., Pless, R., García-Morales, E., Kosanke, H., Hernández-Castro, R., Bedi, J., López-Merino, A., Velázquez-Guadarrama, N., Jiménez-Rojas, L. & Contreras-Rodríguez, A. (2015). Brucellosis outbreak in a rural endemic region of Mexico – a comprehensive investigation. *Veterinaria Italiana*, 51 (3), 185-190.
  - Motta, J., Waltero, I. & Abeledo, M. (2013). Prevalencia de anticuerpos al virus de diarrea viral bovina, herpesvirus bovino 1 y herpesvirus bovino 4 en bovinos y búfalos en el Departamento de Caqueta, Colombia. *Revista de Salud Animal*, 35 (3), 174-181.
  - Neil, J., Dubovi, E. & Ridpath, J. (2015). Identification of aminoacid changes in the envelope glycoproteins of bovine viral diarrhea viruses isolated from alpaca that may be involved in host adaptation. *Veterinary Microbiology*, 179, 299-303.
  - Oseguera-Montiel, D., Frankena, K., Udo, H., Keilbach-Baer, N. & Van der Zijpp, A. (2013). Prevalence and risks factors for brucellosis in goats in areas of Mexico with and without brucellosis control campaign. *Tropical Animal Health and Production*, 45, 1383-1389.
  - Quispe, R., Cama, A., Rivera, H. & Araínga, M. (2008). El virus de la Diarrea Viral en Bovinos criollos de la provincia de Melgar, Puno. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 19 (2), 176-182.
  - Romero-Salas, D., García-Vázquez, Z., Montiel-Palacios, F., Montiel-Peña, T., Aguilar-Domínguez, M., Medina-Esparza, L. & Cruz-Vázquez, C. (2010). Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle in Veracruz, Mexico. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9 (10), 1445-1451.
  - Rothman, K. (2002). *Epidemiology, an introduction*. USA: Oxford University Press.

- Ramos, A. (2014). *Frecuencia de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), diarrea viral bovina (DVB) y leptospirosis, en bovinos de doble propósito, en el municipio de San Juan Cotzocón, Oaxaca, México. (Tesis de licenciatura)*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Rivera, H., Benito, A., Ramos, O. & Manchego, A. (2004). Prevalencia de enfermedades de impacto reproductivo en bovinos de la estación experimental de trópico del centro de investigaciones IVITA. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 15 (2), 120-126.
- Salinas-Meléndez, J., Zárate-Ramos, J., Ávalos-Ramírez, R., Hernández-Escareno, J., Hernández-Vidal, G., González-Hernández, G. & Riojas-Valdés, J. (2011). Prevalence of antibodies against of *Neospora caninum* in dairy cattle in Nuevo Leon, Mexico. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10 (11), 1389-1393.
- Sánchez, F., Morales, E., Martínez, J. & Trigo, F. (2003). Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67, 142-145.
- Solís-Calderón J., Segura-Correa, V. & Segura-Correa, J. (2005). Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatán, Mexico: seroprevalence and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 72 (3), 253-262.
- Wang, F., Deng, M., Huang, Y. & Chang, C. (2015). Structures and functions of Pestivirus glycoproteins: Not simply surface matters. *Viruses*. 7, 3506-3529.