



**UNIVERSIDAD MICHOCANA
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE IBR, BVD
Y *LEPTOSPIRA BORGPETERSENII* SEROVARIEDAD
HARDJO TIPO BOVIS EN EL HATO LECHERO DE
FMVZ-UMSNH**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

Ulises Gómez Sierra

ASESOR: Doctor Manuel Jaime Tena Martínez



MORELIA MICHOCAN, ABRIL DE 2015



**UNIVERSIDAD MICHOCANA
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE IBR, BVD
Y *LEPTOSPIRA BORGPETERSENII* SEROVARIEDAD
HARDJO TIPO BOVIS EN EL HATO LECHERO DE
FMVZ-UMSNH**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

Ulises Gómez Sierra

ASESOR: Doctor Manuel Jaime Tena Martínez



MORELIA MICHOCAN, ABRIL DE 2015

DEDICATORIA

Gracias **Dios** por permitirme haber concluido con éxito, el logro más importante de mi vida. Gracias de verdad, por guiarme en mis estudios con gente que creyó y confió en mí (familia, profesores y amigos), Gracias Dios por darme a lo largo de mi vida y de este proyecto profesional salud, esperanza y fe. No me cansare de darte gracias por todo lo que me has brindado.

Gracias mamá por heredarme esta profesión, gracias porque no has permitido que me falte sustento, gracias por tus esfuerzos dedicados a mi persona, profesional y a mi vida no han sido en vano. Y aunque el camino aún no termina sigues apoyándome en todo, gracias por tu esmero y dedicación, perdona las mortificaciones, preocupaciones y el sufrimiento que te he causado para lograr lo que quiero en mi vida personal y sobre todo profesional, gracias por seguir confiando y creyendo en mi Ma. Ascensión Sierra Arellano Dios te Bendiga hoy y siempre.

A mis hermanos quiero decirles gracias por su apoyo incondicional que me han brindado hasta el día de hoy, espero nunca fallarles y estar para ustedes así como ustedes lo estuvieron para mí todo este tiempo. Gracias Feliz, Ofelia, Jacinto, Fernando, Rubén, Eziqiuo y Deisi gracias Dios me los Bendiga.

A mis tíos(as) quiero decirles gracias por estar siempre apoyándome en todos estos años, por sus consejos que me han ayudado muchísimo a seguir en esta carrera profesional gracias por su apoyo incondicional y por confiar y creer en mí por impulsarme a seguir hasta el final y espero de la misma manera corresponderles sin fallar, gracias tío(a) Roberto Gómez, José Luis Yáñez, Javier Sierra y Ma. Luisa Sierra.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	ii
INDICE DE ANEXOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR, siglas en inglés).....	1
1.2 Diarrea Viral Bovina	2
1.3 Leptospirosis.....	3
1.4 Diagnóstico	4
2. JUSTIFICACIÓN.....	5
3. OBJETIVO	5
4. HIPÓTESIS.....	6
5. MATERIALES Y METODOS	6
5.1 Localización del área de estudio	6
6. RESULTADOS	7
6.1 Resultados de laboratorio para BVD	7
6.3 Resultados de laboratorio para <i>Leptospira borgpetersenii hardjo bovis</i>.....	11
6.4 Análisis de los resultados.....	11
7. DISCUSIÓN	16
8. CONCLUSIONES	20
9. ANEXOS	21
10. LITERATURA CITADA.....	23

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1,- Resultados por medio de la técnica de ELISA para BVD	9
Cuadro 2,- Resultados por medio de la Técnica de ELISA para IBR.....,	10
Cuadro 3,- Cuadro 3. Resultados mediante la Técnica de PCR en tiempo real para determinar la presencia de <i>Leptospira borgpetersenii serovariedad hardjo bovi</i>	11
Cuadro 4,- Porcentaje de animales positivos a las enfermedades de estudio en el sector de bovinos leche de la Posta Zootecnia.....	12
Cuadro 5.- Situación reproductiva de los animales positivos a IBR.....	12
Cuadro 6.- Indicadores de reproducción y producción del sector de Bovinos de Leche del 18 de febrero 2014 al día 13 de julio 2014.....	14
Cuadro 7. Resultados de las vacas + y – a IBR y su estatus reproductivo, aborto y destino.....	15
Cuadro 8.- Resultados de IBR + y – para los parámetros de Reproducción y Producción.....	16

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- Información individual de las vacas con prueba para IBR.....	21
Anexo 2. Valores promedio, mínimos y máximos para algunos indicadores en vacas positivas a IBR.....	22
Anexo 3 Número de vacas por estado reproductivo.....	22

RESUMEN**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE IBR, BVD Y *LEPTOSPIRA BORGPIETERSENII* SEROVARIEDAD *HARDJO TIPO BOVIS* EN EL HATO LECHERO DE FMVZ-UMSNH**

Las enfermedades que afectan la eficiencia reproductiva impactan de manera importante la rentabilidad de las empresas ganaderas. Dentro de estas enfermedades se encuentra la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR Siglas en Ingles), la Diarrea Viral Bovina (BVD, Siglas en Ingles) y la leptospirosis. El Objetivo del presente trabajo es determinar la presencia de las enfermedades: IBR y BVD mediante la determinación de la presencia de anticuerpos por la prueba de ELISA y de Leptospirosis causada por *Leptospira borgpetersenii serovariedad hardjo tipo bovis* mediante la prueba de PCR a tiempo real en las vacas del Sector de Bovinos de Leche de la Posta Zootécnica de la FMVZ-UMSNH. Se tomó una muestra de sangre a todas las vacas productoras de leche y vaquillas en edad reproductiva (n=58 vacas) para las enfermedades de IBR y BVD. Para *Leptospira* se tomaron 16 muestras de orina a vacas no gestantes, y para obtener mayor concentración de la bacteria de leptospira se aplicó 5ml de Furosemida 30 minutos antes de la toma de muestra. Las muestras de orina y los sueros fueron procesados en el Laboratorio de Patología Animal en Calamanda, Qro., dependiente de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. La frecuencia de acuerdo a los sueros procesados fue para animales seropositivos a IBR del 14.28% (4 de 28), mientras que a BVD el 100% fueron seronegativos a la enfermedad. En el caso de la *Leptospira* no fue posible determinar la frecuencia de animales positivos debido a que las muestras se mezclaron en 6 pools para su diagnóstico, resultando un pool positivo. Se confirmó la presencia de IBR y *Leptospira borgpetersenii serovariedad hardjo tipo bovis* y no se encontró la presencia de BVD.

Palabras Clave: Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, Diarrea Viral Bovina, *Leptospira borgpetersenii serovariedad hardjo tipo bovi*, PCR a Tiempo Real y ELISA.

ABSTRACT**DETERMINATION OF THE PRESENCE OF IBR, BVD AND *LEPTOSPIRA BORGPIETERSENII* SEROVAR *HARDJO BOVIS* TYPE IN DAIRY HERD FMVZ-UMSNH**

Diseases affecting the reproductive efficiency significantly impact the profitability of livestock enterprises. Within these diseases is Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR acronym in English), bovine viral diarrhea (BVD, acronym in English) and leptospirosis. The objective of this study is to determine the presence of diseases: IBR and BVD by determining the presence of antibodies by ELISA and leptospirosis caused by *Leptospira* serovar hardjo type borgpetersenii bovis by testing real-time PCR in Cattle Sector cows milk from Posta Zootécnica the FMVZ-UMSNH. A blood sample was taken at all lactating cows and heifers of reproductive age (n = 58 cows) for IBR and BVD disease. To *Leptospira* 16 urine samples at nonpregnant cows were taken, and for greater concentration of leptospira bacteria was applied 5ml Furosemide 30 minutes before sampling. Urine samples and sera were processed at the Laboratory of Animal Pathology at Calamanda, QC., Under the Secretariat of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food. The frequency according to processed sera was for IBR seropositive animals to 14.28% (4 of 28), while BVD 100% were seronegative disease. For *Leptospira* was not possible to determine the frequency of positive animals because the samples were mixed in 6 pools for diagnosis, resulting in a positive pool. IBR and the presence of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type bovis was confirmed and the presence of BVD not found.

Keywords: infectious bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhea, borgpetersenii *Leptospira* serovar hardjo type bovi, Real Time PCR and ELISA.

1. INTRODUCCIÓN

De los 8, 671,516 vientres de ganado bovino en México, aproximadamente el 34,2% (2,966,117) corresponden a ganado lechero distribuido principalmente en las cuencas lecheras (Morales y Siever, 2002; INEGI, 2007). La producción por vaca se ha incrementado y algunas enfermedades pueden estar asociadas a una depresión de sus defensas que ocasionan pérdidas de producción de leche e incrementando el desecho por vacas improproductivas o pobre desempeño reproductivo (Bosch *et al.*, 1996).

Las enfermedades que afectan la eficiencia reproductiva impactan de manera importante la rentabilidad de las empresas ganaderas. Dentro de estas enfermedades se encuentra la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), la Diarrea Viral Bovina y la leptospirosis (Paucar, 2008).

1.1 Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR, siglas en inglés)

Según Alvarado (1997) la IBR es una enfermedad producida por un herpesvirus que está ampliamente extendido en México y con una distribución mundial (Correa, 1986). Barrera (2005) en estudios serológicos identificó que la enfermedad esta diseminada en las principales zonas ganaderas del país. No se han realizado estudios en Michoacán para determinar el efecto de la seropositividad de IBR en el comportamiento reproductivo de hatos lecheros. En el 2003 se muestrearon serológicamente 14 estados de la República Mexicana, mediante la técnica de ELISA, y los resultados de laboratorio indicaron que el Virus de IBR está presente en un 57.29 % de los animales (Reyes *et al.*, 2003).

La IBR causa enfermedad respiratoria, debilita el sistema inmunológico, reduce la producción de leche, afecta la reproducción y también da como resultado enfermedad neonatal o aborto. Dependiendo de cuándo se haya infectado el ganado el resultado varía desde defectos congénitos, a problemas de fertilidad e incluso la muerte (Lluén, 2008). El aborto es la consecuencia más grave desde un punto de vista económico y los tipos de aborto son: muerte embrionaria temprana, aborto en el tercio medio de la gestación y aborto

en el último tercio de gestación, pues la mayoría de los abortos ocurren en el último tercio de la gestación (Rivera, 2001; Guarino y Salazar, 2001; Trabattoni y Conigliano, 2005; Paucar, 2008).

Las vacas también pueden presentar infertilidad a veces asociada a cambios en la función ovárica y secreción de gonadotropina y progesterona (Lluén, 2008). Durante la infección aguda puede detectarse una breve viremia eliminando virus en las descargas nasales. Otras veces, la infección aguda se presenta con fiebre, neumonía, diarrea y un 9.7% de muerte súbita, con signos hemorrágicos. La muerte puede ocurrir a los 3 o 4 días después de iniciados los síntomas (Trabattoni y Conigliano, 2005).

1.2 Diarrea Viral Bovina

La Diarrea Viral Bovina (BVD) es producida por un Pestivirus presente en todo el mundo y que afecta en diferente grado a todos los segmentos de la producción bovina (Cajal y Alvares, 2012). En un estudio realizado en la República mexicana se encontró que el virus de la BVD está ampliamente distribuido en los animales lecheros con una prevalencias de un 65.60% (Guarino y Salazar., 2001; Morales, 2002; Reyes *et al.*, 2003).

El 70 a 90% de las infecciones causadas por el virus de la BVD son subclínicas, pero también pueden causar manifestaciones clínicas o asociarse con otros agentes infecciosos (Cajal y Alvares, 2012). Cuando es el único agente que se encuentra infectando al ganado las manifestaciones clínicas se pueden dividirse en 2 grupos: Enfermedades que ocurren cuando el feto está infectado y enfermedades que ocurren cuando el ganado se infecta después del nacimiento (Lluén, 2008; Cajal y Alvares, 2012). Durante la infección aguda puede detectarse una breve viremia eliminando virus en las descargas nasales. Otras veces, la infección aguda se presenta con fiebre, neumonía, diarrea y un 4.8% de muerte súbita, con signos hemorrágicos, en grupos de cualquier edad (Rivera, 2001; Trabattoni *et al.*, 2005; Paucar, 2008; Vargas, 2012).

1.3 Leptospirosis

La Leptospirosis es una de las enfermedades infecciosas que pueden afectar la reproducción animal, además de tener un potencial zoonótico. Esta enfermedad está ocasionada en los bovinos, generalmente, por dos especies patógenas: *Leptospira interrogans* y *Leptospira borgpetersenii*. Tiene una amplia distribución mundial, es de curso agudo o crónico; ocasionando grandes pérdidas económicas a la ganadería nacional tanto en hatos de carne como de leche. Las pérdidas económicas son por causar abortos, reabsorciones embrionarias, mastitis, infertilidad, nacimiento de animales débiles, así como por la disminución en la producción láctea (Rivera, 2001; CFSPH, 2005; Paucar, 2008; Lluén, 2008).

En el caso de los bovinos se acepta que son leptospiras *interrogans serovar hardjo tipo prajitno* y la leptospira *Borgpetersenii serovar hardjo tipo bovis* las que están mejor adaptadas a la especie doméstica.

Cuando una serovariedad diferente infecta a individuos de una especie que no es la de mantenimiento, generalmente ocasiona “brotes epidémicos” caracterizados por cuadros clínicos manifiestos fáciles de identificar. Una vez que los animales se recuperan de la enfermedad, la serovariedad desaparece pues difícilmente se logra un estado de portador asintomático con cronicidad. En estos casos los títulos de anticuerpos detectados son más elevados. (Moles *et al.*, 2007).

En nuestro país se cuenta con reportes que aseguran la existencia de la *Leptospira* en humanos y otras especies animales, pero no hay ninguna investigación que asegure la positividad o el tipo de serovariedad que se encuentra presente en roedores del área urbana, razón por la cual, es necesario investigar, ya que este animal juega un papel importante en la cadena biológica de la enfermedad. La enfermedad se presenta en forma brusca manifestándose con fiebre, dolor de cabeza, mialgia, malestar general o postración, náuseas o vómitos, dolor abdominal, diarrea y artralgia (Herrera, 2001; CFSPH, 2005).

1.4 Diagnóstico

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) se basa en el uso de antígenos o de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática pudiendo ser revelada mediante la adición de un substrato específico que en contacto con la enzima, producirá un color observable a simple vista y cuantificable por un lector de densidad óptica. La técnica de ELISA brinda la posibilidad de analizar un gran número de muestras que presenta alta sensibilidad, y alta especificidad de manera sencilla, rápida y económica (Meléndez *et al.*, 1989; Ruiz., 2001 y Sierra *et al.*, 1993)

La prueba de Microaglutinación (MAT) es el método de diagnóstico estándar de referencia internacional para la confirmación serológica de una infección de leptospira reciente y pasada. Esta técnica se emplea para detectar anticuerpos anti-leptospiras en el suero, identificar los aislamientos, clasificar cepas y servir de base para evaluar cualquier otro método serológico para el diagnóstico de esta enfermedad. En la estandarización del MAT, es muy importante considerar: La densidad correcta del cultivo usado como antígeno. Esta densidad debe ser aproximadamente de $1,5$ a 2×10^8 leptospiras (Agudelo, 2008).

El diagnóstico preciso continua siendo una limitante pues las pruebas rutinarias como la microaglutinación ya que no son capaces de diferenciar los serovares más comunes e importantes en el ganado bovino como son *hardjo prajitno* y *hardjo bovis*, pues aun cuando son genéticamente distintos serológicamente son indistinguibles por lo que se requiere de herramientas de diagnóstico específicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar con precisión el tipo de leptospira en animales infectados.

La PCR, es una prueba de diagnóstico molecular muy sensible y específico que ha servido para detectar e identificar leptospiras en sangre, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso y orina y puede diferenciar con rapidez las formas patógenas de las no patógenas (Greene *et al.*, 2008 y Herschhorn, 2010)

A su vez, la PCR en tiempo real es un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa tradicional, que ha incorporado marcas fluorescentes a los partidores; permite monitorizar la reacción en línea a través de un software; lo cual presenta mayor sensibilidad, rapidez y eficacia que el proceso de PCR convencional (Costa, 2004; Espy *et al*, 2006). Sumado a ello, tiene la ventaja de permitir un diagnóstico temprano y exacto, aun cuando los pacientes estén sometidos a terapia de antibióticos (Bharti *et al*, 2003).

Existen diferentes tipos de reactivos que pueden ser utilizados para realizar la PCR en tiempo real, entre ellos el SYBR Green y las pruebas de hibridación específicas como: sondas de hidrólisis, molecular beacons y sondas FRET (Espy *et al*, 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

El desempeño reproductivo de un hato depende de muchos factores. Dentro de los principales se encuentran el estado nutricional, la detección de estros, el manejo de semen y el estado de salud de las vacas. En el caso del Sector de Bovinos de leche de la FMVZ-UMSNH, sus indicadores se encuentran por debajo de lo recomendado presentando los siguientes indicadores: 2.8 servicios por concepción; intervalo entre servicios de 75 días; 15 meses de intervalo entre partos y una tasa de concepción de 24%, un 5% de momificaciones, y un 8% de abortos. Por lo que es necesario realizar estudios que permitan saber si existe alguna enfermedad infecciosa que está afectando estos indicadores, con la finalidad de ir descartando los factores que afectan el desempeño reproductivo del hato.

3. OBJETIVO

El Objetivo del presente trabajo es determinar la presencia de IBR y BVD mediante el diagnóstico por serología (ELISA) y de Leptospirosis (*Leptospira borgpetersenii serovariedad hardjo tipo bovis*) mediante la prueba PCR a tiempo real en las vacas del Sector de Bovinos de Leche de la Posta Zootécnica de la FMVZ-UMSNH.

Si es afirmativo el diagnóstico de que estas enfermedades están afectando la explotación, se procederá a conocer la situación reproductiva y productiva de cada animal y poder evaluar la relación que existe entre la prueba positiva con la presencia de estas enfermedades.

4. HIPÓTESIS

Las vacas que muestren la presencia de IBR, BVD y *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo tipo bovis* en el hato lechero, mostrarán un pobre desempeño reproductivo en comparación con aquellas que están libres de estos agentes infecciosos.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Localización del área de estudio

La investigación se llevó a cabo en el sector de Bovinos Productores de Leche de la Posta Zootécnica perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, ubicada en el km. 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro.

El muestreo se realizó el 18 de Febrero 2014 y se tomó una muestra de sangre a cada vaca adulta productora de leche y vaquillas en edad reproductiva (n=58 vacas) para detectar contra IBR y BVD. Los materiales que se utilizaron para la toma de muestras sanguíneas fueron: tubos vacutainer la tapa roja al vacío, para obtención del suero sin anticoagulante (serologías); una chaqueta o camisa para vacutainer; agujas para vacutainer. En el tubo de vacutainer se anotó la identificación del animal.

La sangre fue colectada mediante punción en la vena coxígea. Se extrajeron de 7 a 10 ml de sangre por animal, evitando mover el tubo para no provocar hemolisis y se dejó a temperatura ambiente en un ángulo de 30 grados hasta formarse el coágulo (30 minutos); se procedió a separar el suero y se centrifugo de 1500 a 3000 rpm por 10 a 15 minutos. Después, se utilizó una pipeta Pasteur estéril, y se colocó por alícuotas en crioviales con la identificación de cada animal. Las muestras se conservaron en congelación a -20 °C hasta su transporte al Laboratorio de Patología Animal en Calamanda, Qro., dependiente de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, donde fueron procesadas. Se utilizó la prueba de ELISA para el diagnóstico de la IBR y BVD

Para detectar anticuerpos contra *Leptospira* se tomaron 16 muestras de orina a vacas no gestantes; se recolectaron 25 ml de orina en frascos limpios y para obtener mayor concentración de la bacteria de leptospira se le aplicó, 30 minutos antes de obtener la muestra, 5ml de Furosemida. Se identificaron las muestras y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su transporte al Laboratorio de Patología Animal en Calamanda, Qro., dependiente de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, donde fueron procesadas en pools por la técnica de PCR en tiempo real. Con estas 16 muestras de orina se conformaron 6 pools para realizar la prueba de PCR, en 4 de ellos se mezcló la muestra de 3 vacas y en 2 pools el de 2 vacas, y todas las vacas cuentan con información sobre eventos reproductivos y de producción de leche. Para la valoración de la eficiencia reproductiva se emplearon los siguientes indicadores: días abiertos, servicios por concepción, intervalo entre servicios, abortos y destino al terminar la lactancia.

El procesamiento de la información obtenida se realizó mediante el uso de herramientas de estadística descriptiva. Para evaluar el efecto sobre el desempeño reproductivo de las enfermedades, si es que se encuentran presentes. Se realizó la prueba de Chi cuadrada (comparación de proporciones) para comparar animales positivos y negativos en los siguientes indicadores: Estado reproductivo, presentación de aborto, y destino al terminar la lactancia. La prueba de “T” de student (comparación de medias) se empleó para analizar las siguientes variables: Días posparto, días abiertos, servicios por concepción, condición corporal, producción de leche a 305 días y número de partos.

6. RESULTADOS

De las 58 muestras de sueros enviados para la prueba de ELISA solo se realizó en 28 y las 30 muestras restantes se descartaron por presentar hemolisis.

6.1 Resultados de laboratorio para BVD

Las 28 muestras de suero para BVD salieron Negativas (cuadro 1).

En base a los resultados no se confirmó la presencia de anticuerpos contra BVD en el hato productor de leche de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

6.2 Resultados de laboratorio para IBR

En la prueba de ELISA para la presencia de IBR, se encontraron 4 sueros positivos (vacas número 6, 9, 308, y 323) en las 28 muestras (Cuadro 2).

Respecto a la densidad óptica de los resultados se confirma la presencia de IBR ya que se encontraron 4 sueros positivos pertenecientes a los animales con la siguiente identificación: 6, 9, 308, 323. El promedio de densidad óptica para los animales positivos fue 1.0285, y el promedio de sueros negativos es de 0.075 estando bajo de lo indicado de las pruebas de ELISA.

Cuadro 1. Resultados por medio de la técnica de ELISA para BVD.

ID°	Densidad Óptica	RESP(% IN)	Interpretación
PROM. NEG.	1.797		
PROM. POS.	0.365		E. VALIDO
67	1.462	18.62	NEG
63	1.6	10.94	NEG
65	1.516	15.61	NEG
49	1.561	13.11	NEG
323	1.531	14.78	NEG
333	1.472	18.06	NEG
50	1.427	20.57	NEG
6	1.368	23.85	NEG
61	1.48	17.62	NEG
316	1.617	9.99	NEG
2-AY	1.521	15.34	NEG
308	1.46	18.73	NEG
332	1.503	16.34	NEG
9	1.459	18.79	NEG
62	1.387	22.79	NEG
325	1.476	17.84	NEG
59	1.552	13.61	NEG
347	1.597	11.10	NEG
2	1.013	9.40	NEG
8	1.243	-11.10	NEG
33	1.348	-20.50	NEG
42	1.517	-35.60	NEG
57	1.333	-19.20	NEG
58	1.294	-15.70	NEG
60	1.175	-5.10	NEG
66	1.326	-18.60	NEG
305	0.925	17.30	NEG
311	1.229	-9.90	NEG

Cuadro 2. Resultados por medio de la Técnica de ELISA para IBR.

Nº	Densidad Óptica	RESP(IRPC)	Interpretación
PROM. NEG.	0.075		
PROM. POS.	1.0285		E. VALIDO
67	0.064	-1.20	NEG
63	0.063	-1.30	NEG
65	0.058	-1.80	NEG
49	0.128	5.60	NEG
323	0.523	47.00	POS
333	0.093	1.90	NEG
50	0.062	-1.40	NEG
6	0.596	54.60	POS
61	0.074	-0.10	NEG
316	0.069	-0.60	NEG
2-AY	0.124	5.10	NEG
308	0.367	30.60	POS
332	0.177	10.70	NEG
9	0.234	16.37	POS
62	0.181	11.10	NEG
325	0.095	2.10	NEG
59	0.073	-0.20	NEG
347	0.079	0.40	NEG
2	0.075	-2.80	NEG
8	0.075	-2.80	NEG
33	0.091	-0.90	NEG
42	0.095	-0.40	NEG
57	0.17	8.80	NEG
58	0.08	-2.20	NEG
60	0.092	-0.70	NEG
66	0.075	-2.80	NEG
305	0.197	12.00	NEG
311	0.088	-1.20	NEG

6.3 Resultados de laboratorio para *Leptospira borgpetersenii* hardjo bovis

Los resultados de laboratorio para determinar la presencia de *Leptospira Borgpetersenii serovariedad hardjo bovis* mediante PCR en Tiempo Real fueron: el pool 2 constituido por las vacas con los números de identificación 308, 70, y 305 resulto positivo y los pools 1, 3, 4, 5 y 6 fueron negativos (cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados mediante la Técnica de PCR en tiempo real para determinar la presencia de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad hardjo bovis.

		Resultados		
	Concepto	Referencia	Control Positivo	Valor
1	CONTROL DE EXTRACCION	Positivo	30.59	5.00
2	CONTROL DE EXTRACCION	Positivo	18.78	5.00
3	CONTROL POSITIVO	Positivo	24.07	5.00
4	14-1910 Pool 1	Negativo		
5	14-1910 Pool 2	Positivo	34.52	5.00
6	14-1910 Pool 3	Negativo		
7	14-1910 Pool 4	Negativo		
8	14-1910 Pool 5	Negativo		
9	14-1910 Pool 6			

6.4 Análisis de los resultados

En resumen, la frecuencia de animales seropositivos a IBR fue del 14.28% (4 de 28) y para BVD el 100% fue seronegativos a la enfermedad. En el caso de la *Leptospira* no fue posible determinar la frecuencia de animales positivos debido a que no se identificaron a los individuos que eran portadores de la bacteria (cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de animales positivos a las enfermedades de estudio en el sector de bovinos leche de la Posta Zootecnia

PORCENTAJE DE RESULTADOS POSITIVOS POR ENFERMEDAD		
IBR	BVD	LEPTOSPIRA
14.28	0.00	1 pool de 5

En el cuadro 5 se muestra los indicadores reproductivos de los animales que resultaron positivos a IBR; un animal (ID 9) tiene un historial de aborto. Tres de los animales positivos fueron descartados por problemas reproductivos, ya que no presentaron calor de manera regular y cuando se les dio servicio no quedaron gestantes. Los animales identificados se encuentran en anestro por lo tanto este grupo recibió 5 servicios y solo un animal quedo gestante. Entonces IBR tiende a asociarse a días abiertos, a aborto y a mayor número de servicios por concepción y por lo tanto, se incrementa el desecho de vacas.

Cuadro 5. Situación reproductiva de los animales positivos a IBR

Vaca ID	Edad meses	No Parto	Días abiertos	No. Servicios concepción	Aborto	Gestante	Destino
6	87	4	300	2	No	Vacía	Desecho
9	73	2	685	1	Si	Vacía	Desecho
308	96	4	612	0	No	Vacía	Desecho
323	56	2	510	2	No	Gestante	Parir

El cuadro 6 presenta los valores objetivo de los indicadores del desempeño reproductivo y los del hato en estudio del 18 de febrero al 13 de julio de 2014, fecha en que se recibieron los resultados. Se observan fallas en el periodo de espera voluntario. Las vacas tienen su primer celo posparto hasta el día 87, cuando el valor objetivo es de 42 días, conciben hasta

el día 158, cuando el valor objetivo es los 80 días. Los días a primer servicio son 93 días y el valor objetivo de 45 días; el intervalo entre partos es de 429 días y valor objetivo de 365 días y el periodo de gestación es de 271 días y el valor objetivo de 282 días.

Los parámetros del 6 al 11 indican que los días desde inicio de servicios primer calor, debe de haber 11 días y el valor obtenido fue de 45 días. Los días desde el inicio de servicios a primer servicio debe ser a los 11 días y el valor obtenido fue de 51 días. Los días desde inicio de servicios a concepción deben ser de 32 días y en el valor obtenido fue de 70 días. El Intervalo entre servicios deben de ser de 21 días y el valor obtenido son 78 días; intervalo entre celos es de 21 días y el valor obtenido es de 62 días; el porcentaje de intervalo entre celos correctos es de 20, cuando la meta es tener el 75% de celos correctos.

El tercer grupo de parámetros del 12 al 16 se describen a continuación que los servicios por concepción indican que no hay diferencias entre los valores objetivo y los obtenidos en el hato. La tasa de concepción debe ser de 50 % y el valor objetivo fue de 45%. La duración de lactancia es 19 días más larga que el valor objetivo debido a la baja tasa de preñez.

El grupo de parámetros del 1 al 5, indica que hay fallas para la involución uterina y el reinicio de la actividad ovárica. La involución uterina se retarda cuando hay infecciones y el reinicio de la actividad ovárica se retarda debido principalmente al balance energético negativo de la vaca. El segundo grupo, del 6 al 11, indica que hay fallas en la detección de estros. El tercer grupo, de los parámetros 12 al 16, indica que el hato tiene fallas para concebir. En el anexo 1 se presenta la información individual de los animales a los que se les realizó la prueba de diagnóstico para IBR y en el anexo 2 y 3 se observan los indicadores con sus respectivos promedios máximos y mínimos del hato que muestreo.

El desempeño reproductivo es el resultado de una interacción multifactorial, tal como: estado nutricional, nivel de producción, detección de estros, técnica de inseminación artificial, manejo de los animales pos parto y la presencia de enfermedades. Desde esta perspectiva, la presencia de IBR y Leptospirosis variedad *borgpetersenii hardjo bovis* en el hato estudiado no es la responsables exclusiva del pobre desempeño reproductivo, sino que pueden estar involucrados otros factores que interaccionan con la presencia de estos microorganismos.

**Cuadro 6. Indicadores de reproducción y producción del sector de Bovinos de Leche
18 de febrero 2014 al día 13 de julio 2014**

Parámetro	Valor objetivo	Valor obtenido
# vacas		29
1.- Días parto - 1er. Celo	42	87
2.- Días parto – concepción	80	158
3.- Días parto - 1er. Servicio	45	93
4.- Intervalo entre partos (días)	365	429
5.- Período de gestación (días)	282	271
6.- Días desde inicio de servicios - 1er calor *	11	45
7.- Días desde inicio de servicios - 1er servicio*	11	51
8.-Días desde inicio de servicios - concepción *	32	70
9.- Intervalo entre servicios (días)	21	78
10.-Intervalo entre celos (días)	21	62
11.- % intervalo entre celos correcto	75	20
12.- Servicios / Concepción	2	2.2
13.- Tasa de concepción (%)	50	45
14.- Duración de la lactancia (días)	305	324
15.- Leche por lactancia (kg)	6000	6,477
16.- Leche a 305-días (kg)	6000	6,110

* Se consideran Días de inicio de Servicio o Periodo de espera voluntario= al día 60 después del parto

En el Cuadro 7 se observa que el único indicador de que mostro una diferencia estadística significativa ($p < 0.5$) fue el *Destino de la vaca al terminar la lactancia*, donde los animales positivos a IBR tienen una frecuencia de ser descartados más alta que con resultado

negativo. La presentación de aborto no observó diferencia estadística significativa entre animales negativos y positivos a IBR aunque las proporciones de animales abortados fue mayor para los animales positivos (25% vs 4.5%) lo que indicaría una tendencia a que animales positivos a IBR presentan una frecuencia más alta a presentar aborto. En el concepto de Destino se encuentra que de las 7 vacas en desecho 4 salieron negativas y 3 positivas por lo tanto se encontró una diferencia significativa en la prueba de chi cuadrada y de las vacas reproductoras 18 salieron negativas y una positiva, por lo tanto IBR no está generando abortos.

Cuadro 7. Resultados de las vacas + y – a IBR y su estatus reproductivo, aborto y destino

Concepto		ELISA	
		Negativo	Positivo
		Recuento	Recuento
Estatus Reproductivo	Vacía	6 _a	3 _a
	Gestante	13 _a	1 _a
	Servida	3 _a	0 ⁴
Aborto	No	21 _a	3 _a
	Si	1 _a	1 _a
Destino	Desecho	4 _a	3 _b
	Reproductora	18 _a	1 _b

Nota: Los valores de la misma fila que no comparten el mismo subíndice son significativamente diferentes en $p < 0.05$;

4. Esta categoría no se utiliza en las comparaciones porque su proporción de columna es igual a cero.

Los resultados de IBR (Cuadro 8), muestran una diferencia estadística significativa ($p < 0.5$) en días abiertos, mayor en animales que son positivos a IBR que los que salieron negativos, por lo cual tiende a bajar la producción de leche a 305 días; para los días pos

parto, servicios por concepción, condición corporal y los partos no mostraron una diferencia significativa por lo cual IBR no está afectando estos parámetros.

Cuadro 8. Resultados de IBR + y – para los parámetros de Reproducción y Producción

	ELISA	
	Negativo	Positivo
	(Media)	(Media)
Días Pos Parto	370 _a	362 _a
Servicios	2 _a	1 _a
Días abiertos	145 _a	318 _b
Condición Corporal	3.0 _a	3.1 _a
Producción a 305 días	5945 _a	5616 _a
Partos	2.5 _a	3.0 _a

Nota: Los valores de la misma fila que no comparten el mismo subíndice son significativamente diferentes en $p < .05$

7. DISCUSIÓN

El hato estudiado no tiene historial de vacunación por lo tanto los resultados obtenidos confirman la presencia de IBR y *Leptospira Borgpetersenii serovariedad hardjo bovis* y no se confirma la presencia de BVD.

En Querétaro, la prevalencia notificada para IBR es del 90% en el ganado lechero (Escamilla et al., 2007); otro estudio realizado en Michoacán, demostró una prevalencia de 3.4% en este mismo tipo de ganado (Segura-Correa et al., 2010). Y en el hato de la FMVZ-UMSNH de las 28 muestras de suero cuatro (14.28%) resultaron positivas a IBR. Como lo

indica House *et al.*, (1995) en un establo con prevalencia viral generalmente existen animales Persistentemente Infectados (PI). También se reporta que un solo animal PI puede infectar el 90% o más de animales susceptibles.

Después de la primera infección, el virus nunca es completamente removido. Permanece en las células nerviosas en el cerebro como una infección latente de por vida. Sin embargo, bajo condiciones de estrés el virus puede iniciar su multiplicación y puede ser re excretado, generalmente a través de nariz y ojos (Nardelli *et al.*, 2008).

Por ser la IBR una enfermedad viral no existe tratamiento, además el virus de la IBR sobrevive en muchos ambientes siendo altamente contagioso. Por las características anteriores, aún no hay nada para identificar y aislar los animales enfermos, el control de esta enfermedad se realiza mediante el uso de vacunas. Actualmente se dispone de una gama de vacunas que se pueden utilizar de acuerdo a las necesidades y características presentes en una explotación. Existen vacunas con virus vivo-modificado (MLV), vacunas con virus inactivado o muerto (KV).

La edad a vacunar es tan importante como el tipo de vacuna a utilizar. La protección máxima generalmente ocurre hasta aproximadamente tres semanas después de la vacunación. Las becerras por lo tanto deben vacunarse dos a tres semanas antes del destete ya que en esa etapa se inicia el riesgo de contraer la infección (Nardelli *et al.*, 2008).

Los resultados que se tuvieron de la BVD en este hato los resultaron de los sueros fueron todos negativos a esta enfermedad pero no quiere decir que este libre el hato de este virus. No está claro de qué manera el vDVB altera la función ovárica, reduce la fertilidad y también se pueden producir abortos, pero éstos son más frecuentes en las etapas tempranas de la gestación. (Dubovi, 1994).

En los resultados nos indica que unos animales tuvieron abortos uno que salió positivo a IBR y el otro salió negativo, el porcentaje de abortos en este hato es de 7.7 % tomando en cuenta las 26 vacas productoras (2/26), ya que las otras 2 muestras son de terneras. El IBR en relación al tema del aborto, existen datos experimentales y de campo que sugieren que el virus permanece latente en la placenta, y cuando pasa al feto, si lo infecta, produce

lesiones necróticas diseminadas. Bajo ciertas circunstancias aún no determinadas, el virus se reactivaría, invadiría el feto y ocasionaría su muerte (Miller *et al.*, 1991).

Así como la leptospirosis es una enfermedad zoonótica económicamente importante por ser causa de abortos, terneros nacidos muertos y pérdida en la producción de leche. La enfermedad es de distribución mundial y es causada por la bacteria *Leptospira borgpetersenii*. En la leptospirosis se describen dos tipos de hospedadores: los que mantienen a la bacteria en el medio ambiente que son los reservorios y que a menudo son especies silvestres en donde la infección es de tipo subclínica, y los hospedadores incidentales en los cuales la bacteria causa infección que varía desde subclínica hasta aguda. En ambos tipos la bacteria puede ocasionar el aborto, nacidos muertos o nacimientos de terneros débiles (Bolín, 1998).

Este estudio se realizó con la prueba PCR en tiempo real para el diagnóstico de leptospirosis producida por *L. borgpetersenii serovar hardjo bovis*. Uno de los 6 pools resulto positivo a *Leptospira borgpetersenii serovar hardjo bovis* comprobando que la bacteria se encuentra presente en este hato, aunque no fue posible identificar más precisamente los individuos. Debido a que el ganado es el huésped de mantenimiento para *hardjo-bovis*, los animales infectados mantendrán el estatus de portador. Esta bacteria se caracteriza por colonizar el aparato reproductor y renal, manteniendo una excreción urinaria a largo plazo (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2011).

Al existir la enfermedad de IBR y *Leptospira* no quiere decir que sean el factor principal que afecte a los animales pero nos indica que los animales positivos a IBR tienen más problemas que los que son negativos a IBR.

En todo caso si los animales de cualquier edad que fueron vacunados o no han sido vacunados o que no se han recuperado de la enfermedad son susceptibles a padecer estas enfermedades y ser portadores. Uno de los pilares de control de las enfermedades es la identificación y eliminación del animal con infección persistente o animales persistentemente infectado (PI) que son los reservorios y diseminadores de estas enfermedades (Lindberg y Alenius, 1999). Según Miller *et al.*, existen tres cepas de HVB-

1 con diferentes propiedades abortivas, de las cuales solo los subtipos 1 y 2^a producen el aborto.

Aquí se presentan unas vacunas comerciales para tener un mayor control de las enfermedades estudiadas en este hato de la FMVZ-UMSNH. Cattlemaster Gold FP 5 L5 está indicado para la vacunación de ganado sano, incluyendo a las vacas gestantes, como un auxiliar en la prevención del aborto causado por rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR, herpes virus bovino tipo I), becerros persistentemente infectados por el virus de la diarrea viral bovina (tipos 1 y 2), enfermedad respiratoria causada por parainfluenza 3 (PI3), el virus respiratorio sincitial bovino (VRSB) así como de las afecciones reproductivas causadas por la leptospirosis.

Cattlemaster Gold FP 5 L5 es una preparación liofilizada de cepas modificadas químicamente de virus de IBR, PI3 y VRSB vivo modificado. La fracción líquida contiene cepas tipo I y II del virus de diarrea viral bovina inactivados y bacteriana conteniendo cultivos de:

Leptospiras: *Canicola*, *grippotyphosa*, *hardjo*, *icterohaemorrhagiae* y *pomona*. El componente líquido se utiliza para rehidratar al componente liofilizado. Los antígenos virales se propagaron en una línea celular establecida. Este producto contiene una combinación única de adyuvantes, incluyendo Amphigen, para mejorar la respuesta inmune de estas fracciones.

Vacuna Spirovac (Zooetis) es una bacterina utilizada para la prevención de leptospirosis bovina, se usa solo en bovinos. Spirovac es un nuevo producto para la prevención de la infección causada por *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (tipo: Hardjo bovis). Esta bacteria se caracteriza por colonizar el aparato reproductor y renal, manteniendo una excreción urinaria por más de 12 meses. La vacunación se lleva a cabo en ganado sano desde las 4 semanas de edad o más grandes, incluyendo ganado gestante o en lactación, también puede ayudar en la prevención de la infección fetal causada por *Leptospira hardjo bovis*. Las ventajas de Spirovac es una vacuna que detiene la infección de hardjo bovis y los animales son protegidos por un periodo de hasta 12 meses. Cuando se administra previo al servicio, proporciona una fuerte protección placentaria y fetal, resultando en más becerros nacidos vivos. Los becerros pueden ser vacunados a las cuatro semanas de edad

sin ningún problema. Las vacas pueden ser vacunadas sin ningún problema en cualquier estadio de la gestación (PFIZER, 2014).

8. CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia de IBR en el 14% de las vacas muestreadas y de *Leptospira Borgpetersenii* serovariedad *hardjo bovis*. No se confirmó la presencia de BVD en el hato de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH.

Para este hato se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), como la presencia de vacas seropositivas a IBR y *Leptospira Borgpetersenii* serovariedad *hardjo bovis* asociadas a mayor número de desechos y a un mayor número de días abiertos.

Debido a que la vacunación es la forma de prevenir y enfrentar estas enfermedades es necesario implementar programa de vacunación efectivo necesario implementar programas de vacunación efectivos.

9. ANEXOS

En el anexo 1 presenta la información individual de las 26 vacas a las que se les realizó la prueba para IBR.

Anexo 1. Información individual de las vacas con prueba para IBR

ID	P	DPP	Servicios	Estado Reproductivo	Aborto	Destino	Días abiertos	CC	ELISA
332	1	671	1	Vacía	No	Reproducción		3	Neg.
333	1	604	3	Vacía	No	Reproducción		3	Neg.
2-AY	1	489	4	Vacía	Si	Reproducción		2.5	Neg.
63	1	325	1	Gestante	No	Desecho	35	2.5	Neg.
60	1	346	2	Gestante	No	Reproducción	82	3	Neg.
347	1	138	1	Gestante	No	Reproducción	50	3	Neg.
66	1	132	1	Servida	No	Reproducción		2.5	Neg.
9	2	330	1	Vacía	Si	Desecho		3	Pos.
305	2	1211	1	Vacía	No	Desecho		2.5	Neg.
57	2	606	2	Gestante	No	Reproducción	342	3	Neg.
323	2	533	2	Gestante	No	Reproducción	318	4	Pos.
325	2	140	2	Gestante	No	Reproducción	80	2.5	Neg.
61	2	146	2	Servida	No	Reproducción		3	Neg.
62	2	290	2	Servida	No	Reproducción		3	Neg.
50	3	75	0	Vacía	No	Reproducción		3	Neg.
42	3	414	1	Gestante	No	Reproducción	164	4	Neg.
49	3	455	2	Gestante	No	Reproducción	188	3	Neg.
58	3	205	1	Gestante	No	Reproducción	42	3.2	Neg.
59	3	132	2	Gestante	No	Reproducción	78	3	Neg.
316	3	601	5	Gestante	No	Reproducción	440	3	Neg.
6	4	326	2	Vacía	No	Desecho		3	Pos.
308	4	258	0	Vacía	No	Desecho		2.5	Pos.
8	4	297	1	Gestante	No	Reproducción	134	4	Neg.
33	5	468	6	Vacía	No	Reproducción		4.5	Neg.
311	5	302	1	Gestante	No	Reproducción	210	3	Neg.
2	6	87	1	Gestante	No	1	43	2.5	Neg.

ID: Identificación; P: Número de parto; DPP: Días pos parto; CC: condición corporal;

Elisa: 0= Negativo; 1= Positivo

Las vacas 67 y la 70 no tiene aún información de producción y reproducción, por la tanto no hay información. Las vacas (2-AY y 9) abortaron, lo que equivale a 7.7% de vacas abortadas y 7 vacas se destinaron para desecho 26.9%.

En el anexo 2 se presenta los valores promedio, mínimos y máximos para algunos indicadores.

Anexo 2. Valores promedio, mínimos y máximos para algunos indicadores en vacas positivas a IBR

Indicador	Promedio	Mínimo	Máximo
Numero de parto	2.58±1.42	1	6
Servicios por concepción	1.71±1.07	1	5
Días abiertos	158±129	42	440
Intervalo entre partos	437	321	719

Anexo 3 Número de vacas por estado reproductivo

Estado reproductivo	Vacas
Vacías	9
Servidas	3
Gestantes	14
TOTAL	26

En este cuadro se muestran 26 vacas ya que 2 eran terneras aun sin estado reproductivo.

10. LITERATURA CITADA

1. Agudelo, F. P., Restrepo, M, Moreno, N. 2008. Diagnóstico de leptospirosis de muestras de sangre y cultivo por observación en microscopio de campo oscuro. *Biomédica*. 28:7-9.
2. Alvarado, I.A., Mejia, S.P., De Paz, V.O., Labrandero, S.A. 1997. Validación de la vacuna contra rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) cepa Texcoco en condiciones controladas. *Técnica Pecuaria México*. 35.
3. Barrera, C.E., Córdova I.A., de la O, R.F. 2005 Diagnóstico de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina mediante Inmunoperoxidasa REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*VI,(11): noviembre..1-7.
4. Bharti, A., Nally, J., Ricaldi, J., Matthias,M., Diaz, M., Lovett, M., Levett, P.,Gilman, R., Willig, M., Gotuzzo, E. and Vinetz, J. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet. Infect. Dis.* 3(12): 757-771.
5. Bosch,J.C.,Kaashoek, M.J.,Kroese,A.H., Oirschot,J,T. 1996. An attenuated Bovine herpesvirus 1 Marker Vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccine. *Veterinary Microbiology*, 52: 223-224.
6. Cajal, C. y Álvarez, A. 2012. Diarrea viral bovina y sus múltiples efectos en la producción de los hatos lecheros. XXVIII Conferencia Internacional sobre Ganado Lechero. Querétaro, México. Agosto 2012. <http://www.cigal.biz/> [Consulta: Octubre del 2013].
7. Correa, G.P. 1986. Enfermedades virales en ganado lechero. Memoria de la 2ª Conferencia internacional sobre ganado lechero Holstein de México. México, DF. Pp. 90–93.
8. Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22(5): 299-305.
9. Escamilla, H.P, Martinez, M.J., Medina, S.E., 2007. Frequency and causes of infectious abortion in a dairy hard in Queretaro, Mexico. *Can. J. Vet. Res.* 71, 314-317.

10. Espy M. J., J. R., Uhl, L. M., Sloan, S. P., Buckwalter, M. F., Jones, E. A., Vetter, J. D., Yao, N.L., Wengenack, J. E., Rosenblatt, F. R., 3rd Cockerill y T. F. Smith. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 165-256.
11. Greene, C., Sykes, J., Brown, C. y Hartmann, K. 2008. Leptospirosis. En: C. Greene (Ed.). *Enfermedades infecciosas del perro y el gato*. (3a. ed.). Intermédica. Buenos Aires, Argentina.
12. PFIZER, 2014. Spirovac Zooetis. *Vademécum Veterinario IPE Digital | Todos los derechos reservados 1999-2014*. <http://www.veterinarioipe.com.mx/producto/detalle?idp=31406> [Consulta: 24 de abril del 2014].
13. Guarino, H. 2001. Principales enfermedades que afectan la reproducción en bovinos para carne: análisis descriptivo. Rinotraqueitis infecciosa bovina. Sitio argentino de producción animal. http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/08enfermedades_afectan_reproduccion.pdf [Consulta: 7 de Diciembre del 2013].
14. Guarino, H. y Salazar, J. 2001. Principales enfermedades que afectan la reproducción en bovinos para carne: análisis descriptivo. Diarrea viral bovina. Sitio argentino de producción animal. http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/08enfermedades_afectan_reproduccion.pdf [Consulta: 7 de Diciembre del 2013].
15. Hernández-Rodríguez, P., Díaz, A.C., Dalmau, E. A., Quintero, G. M. 2011. Review. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *Journal of Microbiological Methods* 84 (2011) 1–7.
16. Herrera, C.B. 2001. Principales enfermedades que afectan la reproducción en bovinos para carne: análisis descriptivo. Leptospirosis bovina. Sitio argentino de producción animal.

17. Herschhorn A, Hizi A. 2010. Retroviral reverse transcriptases. *Cell Mol Life Sc.* 67: 2717-2747.
18. House, H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea Virus. *Vet Clin North Am Food Animal Practice* 11(3):521-547. http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/08enfermedades_afectan_reproduccion.pdf [Consulta: 7 de Diciembre del 2013].
19. (INEGI) Instituto Nacional De Estadística, Geografía E Informática. 2007. Censo agrícola, ganadero y forestal 2007 en: http://www3.inegi.org.mx/sistemas/tabuladosbasicos/default.aspx?c=17177&s=est_ [Consulta: 30 de octubre 2013].
20. Lindberg, A and S. Alenius. 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol* 64: 197-222.
21. Lluén, G.B.R. 2008. Causas de infertilidad en vacas lecheras. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de san Marcos. Universidad Nacional de Cajamarca. Facultad de Medicina Veterinaria. Revista Electrónica SIRIVS. http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/infertilidad_lluen.pdf [Consulta: 7 de Diciembre del 2013].
22. Magaña, U.A., Solorio, R.J.L. y Segura, C.J.C. 2005. Rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros de la región Cotzio-Tejaro. *Técnica Pecuaria en México*, 43(1): 27-28.
23. Meléndez, L.V., Schuring, G.G., Alejandro A. Schudel, Judy E. Devery Pocius., Linda m., Dellers. 1989. Manual de Diagnóstico Rápido de Enfermedades Virales de los nimaes Utilizando Métodos Inmunoenzimáticos . IICA. Serie Salud Animal. Publicación Científica. Buenos Aires Argentina.
24. Miller JM, Whetstone CA, Van Der Maaten MJ. 1991. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent thre subtypes determinet by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res* 52:458-461.

25. Moles y Cervantes P, Luna Alvarez M, Gavaldan Rosas D. 2007. Aspectos económicos, epidemiológicos de serovariedades de *L. Interrogans* en bovinos en México. Foro complejo abortivo en bovinos, Puebla, México.
26. Morales, C. y Siever, M. 2002. Detección de terneros con infección congénita con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos lecheros de la provincia de Arequipa (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de san Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria, Lima, Perú.
27. Nardelli, S., Farina, G., Lucchini, R., Valorz, C., Moresco, A., Dal Zotto, R., Costanzi, C. 2008. Dynamics of infection and immunity in a dairy cattle population undergoing an eradication programme for Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR). Preventive Veterinary Medicine, Volume 85, Issues 1–2, Pp 68-80.
- 28.** Paucar, L. M. 2008. Diagnóstico y planificación estratégica del manejo reproductivo de cuatro hatos lecheros del cantón Mejía- provincia de pichincha (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Católica Del Ecuador, Escuela De Ciencias Agrícolas Y Ambientales. Ibarra, Imbabura, Ecuador.
29. Reyes, J.M., Vázquez, R. y García J.A. 2003. Seroprevalencia de IBR y BVD en hatos muestreados en México, 2002-2003. <http://www.docstoc.com/docs/43971936/SEROPREVALENCIA-DE-IBR-Y-BVD-EN-HATOS-MUESTREADOS-EN> [Consulta: Octubre del 2013].
- 30.** Rivera, G.H. 2001. Causas frecuentes de aborto bovino. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 12 (2): 117-122.
31. Ruiz, M.L. y Martínez, M.L. 2001. Trichinellosis: Técnica inmunoenzimática de diagnóstico (ELISA). Área de Parasitología, Instituto de Patobiología, INTA, pp 84-87.
32. Sierra, R.N. Alvarado, V.M., Bojórquez, N.L. 1993. Aplicación de ELISA. Para diagnóstico de Algunas Enfermedades Virales de Repercusión Reproductiva en bovinos. CENID-Microbiología– INIFAP- SARH y Pronabive. México. D.F p.p.20-22.

33. (CFSPH) The Center for Food Security y Public Health. 2005. Leptospirosis. institute for international cooperation in animal biologics. Revista, última actualización: Mayo del 2005: 1-2.
34. Trabattoni, E.M y Conigliaro, S. 2005. Centro de Diagnósticos Veterinarios S.a. Laboratorio acreditado por la red de laboratorios de SENASA LI10. Voletín o Revista (20): 4-7. Ávila, G.J. 2000. Bioseguridad en explotaciones lecheras. Enfermedades infecciosas de los bovinos. Artículo (1): 1-2.
35. Vargas, S.D., Góngora, O.A y Correa, J.J. 2012. Enfermedades virales emergentes en ganado de leche de América Latina. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 16 (2): 88-96.