

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Y FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSGRADO CONJUNTO



DETECCIÓN SEROLÓGICA DE PATÓGENOS MULTI-ESPECIE EN
VENADO COLA BLANCA (*Odocoileus virginianus*) EN TRES
MICRORREGIONES DEL NORESTE DE MÉXICO

TESIS

QUE PRESENTA
ERIC GARZA BARRAZA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, N.L., MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**POSGRADO CONJUNTO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Y FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**DETECCIÓN SEROLÓGICA DE PATÓGENOS MULTI-ESPECIE EN
VENADO COLA BLANCA (*Odocoileus virginianus*) EN TRES
MICRORREGIONES DEL NORESTE DE MÉXICO**

TESIS

QUE PRESENTA

ERIC GARZA BARRAZA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE:**

MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, N.L., MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2013


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Y FACULTAD DE AGRONOMÍA

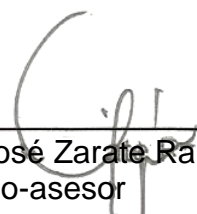



DETECCIÓN SEROLÓGICA DE PATÓGENOS MULTI-ESPECIE EN VENADO COLA BLANCA (*Odocoileus virginianus*) EN TRES MICRORREGIONES DEL NORESTE DE MÉXICO

Aprobación de tesis por el comité particular de


Dr. Ramiro Ávalos Ramírez
Asesor Principal


M.C. Gustavo Moreno Degollado
Co-asesor


Dr. Juan José Zarate Ramos
Co-asesor


Dr. José Antonio Salinas Meléndez
Co-asesor


Dr. Víctor Riojas Valdés
Co-asesor

ESCOBEDO, N.L., MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2013

Dedicatoria

A mis padres, por siempre alentarme a ser mejor cada día, por sus consejos, por apoyarme incondicionalmente y enseñarme que con trabajo y esfuerzo se puede alcanzar cualquier meta y superar cualquier obstáculo.

A mis hermanos, por sus consejos y por estar presentes en todo momento, sobre todo en los difíciles.

A Carmen Centeno, por ser un gran apoyo durante la realización de este proyecto y estar siempre en los momentos importantes de mi vida.

“No pienses en los fracasos de hoy, sino en el éxito que puede llegar mañana. Te has propuesto una tarea difícil, pero tendrás éxito si perseveras, y encontrarás dicha en la superación de obstáculos.”

-Helen Keller

Agradecimientos

Al Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UANL) y al Laboratorio Central Regional de Monterrey por su ayuda en la realización de las pruebas serológicas. A la TLC Leslee Nayelly de la Rosa Contreras por su colaboración para realizar las pruebas de laboratorio. A MVZ Gabriel de León por su ayuda en el procesamiento y análisis de las muestras, y por las conversaciones y enseñanzas, fueron tanto entretenidas como constructivas.

A mi asesor el Dr. Ramiro Ávalos Ramírez por sus consejos, orientación y el apoyo para lograr la finalización de este proyecto. Al Dr. Gustavo Moreno Degollado por su orientación y consejos durante todo este tiempo. Al Dr. José Antonio Salinas Meléndez por su ayuda, su guía y enseñanzas durante el curso de estos años.

A los profesores del Posgrado Conjunto Agronomía-Veterinaria por su dedicación y enseñanzas.

A MVZ Lulú Borrego, José Ángel Ortiz y Natalie Carvayo por su colaboración en la obtención de las muestras.

A mis compañeros Beto, Adán y Uriel, por los momentos que compartimos a lo largo de este tiempo.

Agradezco a mis padres por sus enseñanzas, incomparable apoyo y consejos durante todo este tiempo. A Carmen, porque sin tu apoyo y compañía no lo podría haber logrado, te amo.

Abreviaturas

°C	Grados Centígrados
μl	Micro litro
μm	Micrómetro
Ac-m/HRP	Anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa
CN	Control negativo
CP	Control positivo
DVU	Dilución viral de uso
ECP	Efecto citopático
ELISA	Ensayos inmunoenzimáticos
MAT	Prueba de microaglutinación
MDBK	Madine Darby Bovine Kidney
ml	Mililitro
mm	Milímetros
msnm	Metros sobre el nivel del mar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SE	Suero equino
SN	Seroneutralización

Índice General

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
Abreviaturas.....	IV
Índice General.....	V
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Cuadros.....	XII
Resumen.....	XIII
1. Introducción.....	1
1.1. Justificación.....	3
1.2. Hipótesis.....	3
1.3. Objetivo General.....	4
1.4. Objetivos Específicos.....	4
2. Literatura Revisada.....	5
2.1. Venado cola blanca (<i>Odocoileus virginianus</i>).....	5
2.1.1. Descripción General.....	5
2.1.2. Distribución.....	6

2.2. Unidades para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMA) en México.....	9
2.3. <i>Neospora caninum</i>	11
2.3.1. Características biológicas y taxonómicas.....	11
2.3.1.1. Ciclo de Vida.....	12
2.3.2. Epidemiología.....	15
2.3.2.1. Transmisión.....	15
2.3.2.2. Prevalencia.....	15
2.3.2.2. Factores de riesgo.....	17
2.3.3. Patogenia.....	18
2.3.4. Diagnóstico.....	19
2.4. Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB).....	20
2.4.1. Características biológicas y taxonómicas.....	20
2.4.2. Epidemiología.....	21
2.4.2.1. Transmisión.....	21
2.4.2.2. Prevalencia.....	22
2.4.2.3. Factores de riesgo.....	23

2.4.3. Patogenia.....	24
2.4.4. Diagnóstico.....	25
2.5. <i>Leptospira spp.</i>	26
2.5.1. Características biológicas y taxonómicas.....	27
2.5.2. Epidemiología.....	27
2.5.2.1. Transmisión.....	27
2.5.2.2. Prevalencia.....	28
2.5.2.3. Factores de riesgo.....	29
2.5.3. Patogenia.....	30
2.5.4. Diagnóstico.....	32
2.6. <i>Brucella abortus.</i>	33
2.6.1. Características biológicas y taxonómicas.....	33
2.6.2. Epidemiología.....	34
2.6.2.1. Transmisión.....	34
2.6.2.2. Prevalencia.....	35
2.6.2.3. Factores de riesgo.....	36
2.6.3. Patogenia.....	37

2.6.4. Diagnóstico.....	38
3. Materiales y métodos.....	40
3.1. Estudio epidemiológico.....	40
3.2. Zona de estudio.....	40
3.3. Muestreo.....	41
3.3.1. Metodología del muestreo.....	41
3.3.2. Número de muestras y procedencia.....	42
3.3.3. Colección y manejo de las muestras.....	42
3.4. Análisis serológico.....	43
3.4.1. <i>Neospora caninum</i>	43
3.4.1.1. Descripción general.....	43
3.4.1.2. Componentes.....	43
3.4.1.3. Material necesario.....	44
3.4.1.4. Preparación.....	44
3.4.1.5. Procedimiento.....	45
3.4.1.6. Validación de la prueba.....	46
3.4.1.7. Interpretación de los resultados.....	47

3.4.2. VDVB.....	47
3.4.2.1. Descripción general.....	47
3.4.2.2. Material biológico y reactivos.....	47
3.4.2.3. Material necesario.....	48
3.4.2.4. Equipo e instrumentos.....	48
3.4.2.5. Procedimiento.....	49
3.4.2.6. Cálculo de los resultados y validación de la prueba.....	53
3.4.3. <i>Leptospira spp.</i>	54
3.4.3.1. Descripción general.....	54
3.4.3.2. Material necesario.....	54
3.4.3.3. Preparación.....	55
3.4.3.4. Procedimiento.....	55
3.4.3.5. Interpretación de resultados.....	56
3.4.4. <i>Brucella abortus.</i>	56
3.4.4.1. Descripción general.....	56
3.4.4.2. Material necesario.....	56
3.4.4.3. Procedimiento.....	57

3.4.4.4. Interpretación de resultados.....	57
3.5. Análisis estadístico.....	57
4. Resultados.....	59
4.1. Seroprevalencia de <i>N. caninum</i>	59
4.2. Seroprevalencia de <i>Leptospira spp</i>	59
4.3. Seroprevalencia de VDVB.....	62
4.4. Seroprevalencia de <i>Brucella abortus</i>	62
4.5. Asociación entre la prevalencia de anticuerpos contra <i>N. caninum</i> y la microrregión analizada.....	63
4.6. Asociación entre la prevalencia de anticuerpos contra <i>Leptospira spp</i> y la microrregión analizada.....	64
5. Discusión.....	66
5.1. <i>Neospora caninum</i>	66
5.2. <i>Leptospira spp</i>	67
5.3. VDVB.....	70
5.4. <i>Brucella abortus</i>	71
6. Conclusiones.....	72
7. Literatura citada.....	73

Indice de Figuras

	Página
Figura 1. Distribución original o histórica del venado cola blanca (tomada de Álvarez y Medellín, 2005).....	7
Figura 2. Distribución de subespecies de venado cola blanca en México (Villarreal, 1999).....	8
Figura 3. Localización de las UMA´s extensivas e intensivas registradas hasta Julio 2013 (SEMARNAT, documento disponible en internet).....	10
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i> y la interacción entre los ciclos silvestre y doméstico.	14
Figura 5. Ubicación geográfica de las microrregiones estudiadas.....	40

Indice de Cuadro

	Página
Cuadro 1. Seroprevalencias de <i>N. caninum</i> reportadas en estudios realizados en el Noreste de México en ganado bovino y en el venado cola blanca.....	16
Cuadro 2. Reservorios de las serovariedades analizadas en el presente estudio. (Vado-Solís et al., 2002; Spickler, 2005).....	29
Cuadro 3. Características geográficas y ambientales de las microrregiones analizadas.....	41
Cuadro 4. Número total de muestras obtenidas por microrregión y número de muestras analizadas para la detección de cada patógeno.....	42
Cuadro 5. Seroprevalencia de <i>Leptospira spp.</i> en poblaciones de venado cola blanca en tres microrregiones del Noreste de México.....	61
Cuadro 6. Seropositividad contra distintas serovariedades de <i>Leptospira spp.</i> en poblaciones de venado cola blanca en tres microrregiones del Noreste de México.....	61
Cuadro 7. Seroprevalencia de <i>Brucella abortus</i> , VDVB, <i>Neospora caninum</i> y <i>Leptospira spp.</i> en poblaciones de venado cola blanca en el Noreste de México.....	62
Cuadro 8. Análisis de contingencia de Chi-cuadrada para estimar la asociación entre la seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en venados Cola Blanca Texano con la microrregión de procedencia.....	63
Cuadro 9. Análisis de contingencia de Chi-cuadrada para estimar la asociación entre la seroprevalencia de <i>Leptospira spp.</i> en venados cola blanca texano con la microrregión de procedencia.....	65
Cuadro 10. Factores de riesgo ambientales asociados a anticuerpos contra <i>Leptospira spp.</i> en venado cola blanca en el Noreste de México.....	65

Resumen

Garza Barraza, Eric. Maestría en Ciencia Animal, Posgrado Conjunto Agronomía-Veterinaria, UANL. **Detección Serológica de Patógenos Multi-especie en Venado Cola Blanca (*Odocoileus virginianus*) en 3 microrregiones del Noreste de México.** Dr. Ramiro Ávalos Ramírez, Dr. Gustavo Moreno Degollado, Dr. Juan José Zarate Ramos, Dr. José Antonio Salinas Meléndez, Dr. Víctor Riojas Valdés.

Los objetivos del presente estudio fueron el determinar la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus*, *Leptospira spp.*, Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB) y *Neospora caninum* en venados cola blanca de ranchos dedicados a la explotación intensiva o semi-intensiva ubicados en tres distintas microrregiones del Noreste de México y determinar el grado de asociación con la microrregión de procedencia. Se analizaron 204 muestras de suero sanguíneo procedentes de 3 microrregiones ubicadas en el Noreste de México (Villaldama, N.L.; Linares, N.L.; Villaldama, Tamps.). La detección de anticuerpos contra *N. caninum* fue llevada a cabo con un estuche comercial basado en ELISA de competencia, la presencia de anticuerpos anti-VDVB fue determinada mediante de seroneutralización usando al Virus de la Diarrea Viral tipo 1 (cepa NADL) como antígeno, la prueba de microaglutinación en campo oscuro para fue empleada para detectar anticuerpos contra *Leptospira spp.* (9 serovariedades) y la detección de anticuerpos contra *B. abortus* fue realizada usando prueba de aglutinación en placa usando antígeno teñido con rosa de bengala. Se determinó el grado de asociación entre los índices de seropositividad y de seroprevalencia con la microrregión de procedencia del venado usando la prueba de Chi-cuadrada. La prevalencia de anticuerpos contra *N. caninum* observada fue de 27% (47/175) y por microrregión fue de 18% (12/64) en Villaldama, Nuevo León; 31% (18/59) en Linares, Nuevo León; y de un 33%(17/51) en Villagrán, Tamps. Para leptospirosis se observó una prevalencia de 65% (33/51), por microrregión fue de 35%(6/17) en Villaldama, Nuevo León; 88% (15/17) en Linares, Nuevo León; y de 71% (12/17) en Villagrán, Tamps.; siendo las serovariedades predominantes *L. bratislava* y *L. pomona*. Se observó una relación entre la seroprevalencia de leptospirosis con la microrregión de procedencia de la muestra, encontrando una asociación con características ambientales y geográficas propias de cada microrregión como la precipitación media anual y la altura (OR 7.07, P= 0.0019) y la temperatura (OR 6.67, P= 0.0129). No se encontró evidencia serológica de la presencia de *Brucella abortus* y VDVB dentro de las poblaciones analizadas. Se concluye que existe la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* y *Leptospira spp.* en las poblaciones de venado cola blanca estudiadas, lo cual, sugiere fuertemente la co-circulación de estos patógenos en estas poblaciones de distintas microrregiones del noreste de México. No obstante, es necesario realizar estudios posteriores para determinar el papel que juegan en la salud estos y otros patógenos de rumiantes en la región de estudio.

1. Introducción

En el noreste de México las poblaciones de venado cola blanca y los animales domésticos, particularmente bovinos y caprinos, comparten e interactúan en un mismo hábitat ó nicho ecológico. Estas asociaciones permiten el desarrollo de interacciones múltiples y el compartimento de infecciones y parasitosis en un número y variabilidad considerables. Se estima que más del 70% de los patógenos del ganado doméstico son agentes infecciosos con habilidad para infectar a varias especies de animales silvestres y de estas una considerable proporción son de riesgo para la salud pública.

Como consecuencia de la expansión de las unidades de producción ganadera, la introducción de especies silvestres y domesticas a nuevas áreas y el calentamiento global, entre otros, se ha favorecido la dispersión de agentes infecciosos hacia distintas áreas geográficas y nuevos hospederos. En años recientes ha ocurrido un aumento en la población de venados cola blanca (*Odocoileus virginianus* var. *texanus*) en el noreste del México. Esta especie puede albergar patógenos multi-especie que afectan no solo a esta población sino también que pueden estar involucrados en trastornos productivos en el ganado doméstico. Los patógenos que afectan la reproducción de rumiantes son de especial interés puesto que su actividad redundan en diversas alteraciones que van desde infertilidad hasta aborto y muerte. La detección, monitoreo y eventual asociación de estas enfermedades con factores particulares del medio ambiente son importantes para establecer programas de manejo adecuados y con ello lograr un aprovechamiento sustentable y racional de los recursos naturales.

El presente estudio pretende determinar la presencia de anticuerpos contra cuatro agentes infecciosos multi-especie, involucrados con falla reproductiva tanto en el venado y otros rumiantes domésticos, en poblaciones de Venado cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*) en tres microrregiones distintas del noreste del país. Los patógenos considerados en el presente estudio son: *Neospora caninum*, *Leptospira spp.*, *Brucella abortus* y Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB).

1.1. Justificación

Debido al aumento en la población de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*) en el noreste del país, es necesario monitorear y estudiar las enfermedades que podrían afectar a las poblaciones de venado, por un lado porque este convive y comparte el hábitat con diversas especies animales incluidos ganado doméstico y animales silvestre de la zona y por otro a que el incremento en la población de venados ha intensificado esta convivencia, lo que lo convierte ya sea en un posible reservorio y transmisor de agentes infecciosos y parasitarios ó una especie que puede verse afectada por enfermedades presentes en otras especies, principalmente rumiantes domésticos.

1.2. Hipótesis

Dadas las condiciones agroecológicas del noreste de México y de la epidemiología de los patógenos considerados en el presente estudio, es factible que el venado cola blanca de esta zona posea anticuerpos contra *Neospora caninum*, *Leptospira spp*, *Brucella abortus* y el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB). Así mismo, los índices de seroprevalencia por patógeno pueden estar asociados según las microrregión de estudio.

1.3. Objetivo General

Determinar la seroprevalencia de patógenos selectos, que afectan a rumiantes y no rumiantes, en Venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) ubicados en tres microrregiones en el Noreste de México.

1.4. Objetivos Específicos

- Estimar la seroprevalencia de *Neospora caninum* mediante ELISA.
- Determinar la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* mediante aglutinación en placa y fijación de complemento.
- Determinar la presencia y concentración de anticuerpos contra *Leptospira spp.* mediante la técnica de microaglutinación en placa.
- Determinar la presencia y concentración de anticuerpos contra el VDVB (BVDV-1) mediante seroneutralización.
- Estimar la asociación entre la seroprevalencia de los distintos patógenos múlti-especie en venado cola blanca con las características de las microrregiones de procedencia.

2. Literatura Revisada

2.1. Venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*)

2.1.1. Descripción General

El venado cola blanca es un mamífero perteneciente al orden *Artiodactyla*, familia *Cervidae*. Es de talla mediana y se caracteriza por su cuello largo y relativamente grueso, patas largas, hocico alargado y orejas grandes, presenta glándulas metatarsales y a diferencia del género *Cervus*, no presentan caninos superiores. Presenta dos tipos de coloración en las partes superiores según la estación del año, un pelaje de color rojizo en verano el cual cambia por uno más grueso en invierno de una tonalidad que va de gris a marrón. El pelaje es de color blanco en las partes ventrales, la porción inferior de la cola, garganta y una banda alrededor de los ojos y el morro. Al nacer, los cervatos presentan un color de rojo a amarillento con manchas blancas (moteados) empezando a cambiar de coloración a partir de los 3 a 4 meses de edad (Villarreal, 1999). Presentan dimorfismo sexual, siendo las hembras más pequeñas que los machos. Los machos pueden pesar entre 60 y 160 kg y las hembras entre 40 y 105 kg; puede alcanzar una altura entre 80 a 114 cm y una longitud de 160 a 245 cm, incluida la cola (Álvarez y Medellín, 2005). Las astas son características de los machos, las cuales se encuentran en la parte superior de la cabeza a la altura de las orejas, consiste en una rama principal que se inclina hacia el frente la cual presenta alrededor de 5 ramificaciones que crecen verticalmente. Existe gran variación, sobre todo de talla, entre las subespecies de venado cola blanca. En

Norteamérica, pierden las astas entre los meses de enero y marzo, volviéndoles a crecer entre los meses de abril y mayo, perdiendo la cubierta de piel aterciopelada entre los meses de agosto y septiembre. Las astas alcanzan su máximo desarrollo entre los 4 y 5 años de edad. El venado cola blanca puede ocupar distintos tipos de vegetación como: bosques templados y tropicales, pastizales templados, chaparrales, desiertos, bosque tropical caducifolio y matorrales. Generalmente no forman grandes agrupaciones, la unidad social básica es una hembra adulta, su hija y las crías más recientes. A pesar de presentar una madurez sexual a partir del primer año de edad, generalmente ninguno de los dos sexos se apareará antes de los dos años de edad. Las hembras son poliéstricas estacionales con un ciclo estral de aproximadamente 28 días y un estro con una duración aproximada de 24 horas. La gestación puede durar entre 195 a 212 días; dando a luz a una cría en su primer parto y dos en los partos subsecuentes. El venado cola blanca no llega a vivir más de 10 años de edad en vida libre, pero en cautiverio se ha estimado que pueden vivir alrededor de los 20 años (Nowak, 1999; Villarreal, 1999; Álvarez y Medellín, 2005).

2.1.2. Distribución

El venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es el ungulado con mayor distribución en el continente Americano. Existen 38 subespecies reconocidas de venado cola blanca que se encuentran distribuidas desde el sur de Canadá hasta algunos países de Sudamérica como Brasil y Perú (Ver Figura 1). En México, se han identificado 14 subespecies de venado cola blanca distribuidas en todo el territorio del país excepto la península de Baja California, ocupando 1'814,805 km²

de los 1'958,201 km² de territorio nacional, eso quiere decir que esta especie tiene un área de distribución del 92.7% del territorio nacional. En el noreste del país se reportan las subespecies *Odocoileus virginianus texanus*, *O. v. miquihuanensis* y *O. v. carminis* (Ver Figura 2) (Villarreal 1999; Mandujano et al, 2010).

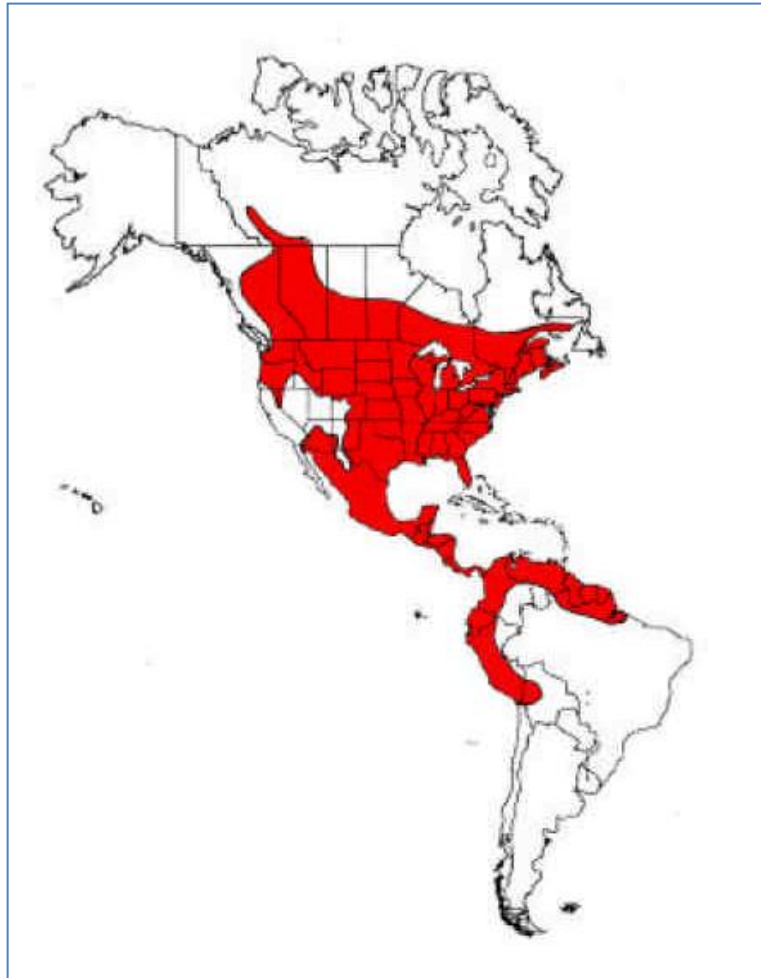


Figura 1. Distribución original o histórica del venado cola blanca (tomada de Álvarez y Medellín, 2005).

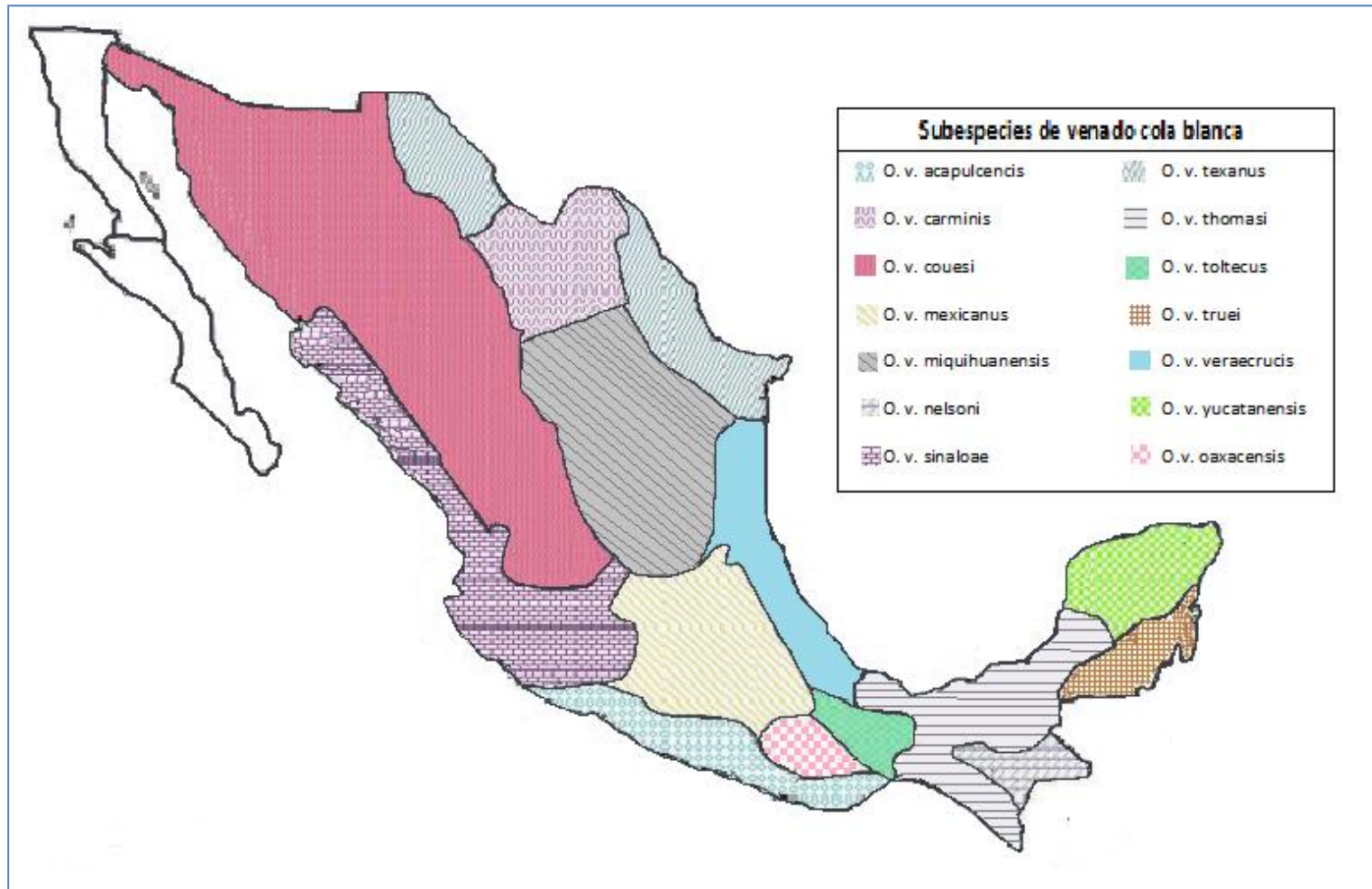


Figura 2. Distribución de subespecies de venado cola blanca en México (Villarreal, 1999).

2.2. Unidades para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMA) en México.

Las Unidades para la conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMA) son los criaderos extensivos e intensivos de fauna silvestre, viveros e invernaderos que permitan la propagación de especies y la elaboración de productos y subproductos que puedan ser incorporados al mercado legal de vida silvestre. Con estas UMA's, se busca el promover esquemas alternativos de producción en los que se tomen en cuenta el cuidado del ambiente mediante el uso racional de los recursos naturales, con esto lograr frenar o revertir los procesos de deterioro ambiental (SEMARNAT/CONAFOR, 2009)

En México, el aprovechamiento cinegético se debe ejercer en UMA's registradas ante la Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Para Junio del 2013 se tenía registro de 11,892 UMA's abarcando alrededor de 38 millones de hectáreas, de las cuales aproximadamente el 70% corresponden a un tipo de manejo de vida libre donde se pretende el manejo, la conservación y el aprovechamiento de alrededor de 300 especies de fauna marina, terrestres y aves, así como de flora y hongos. Respecto al manejo y aprovechamiento del venado cola blanca, se tienen registradas 2,190 UMA's lo cual representa una superficie de alrededor de 6'820,000 de hectáreas. Los estados con mayor número de UMA's son Nuevo León, Coahuila, Sonora, Tamaulipas y Jalisco, siendo Nuevo León el que tiene un mayor registro de ellas con 982 UMA's y que abarcan una extensión territorial de 1'322,869 hectáreas (Reyna,2012).

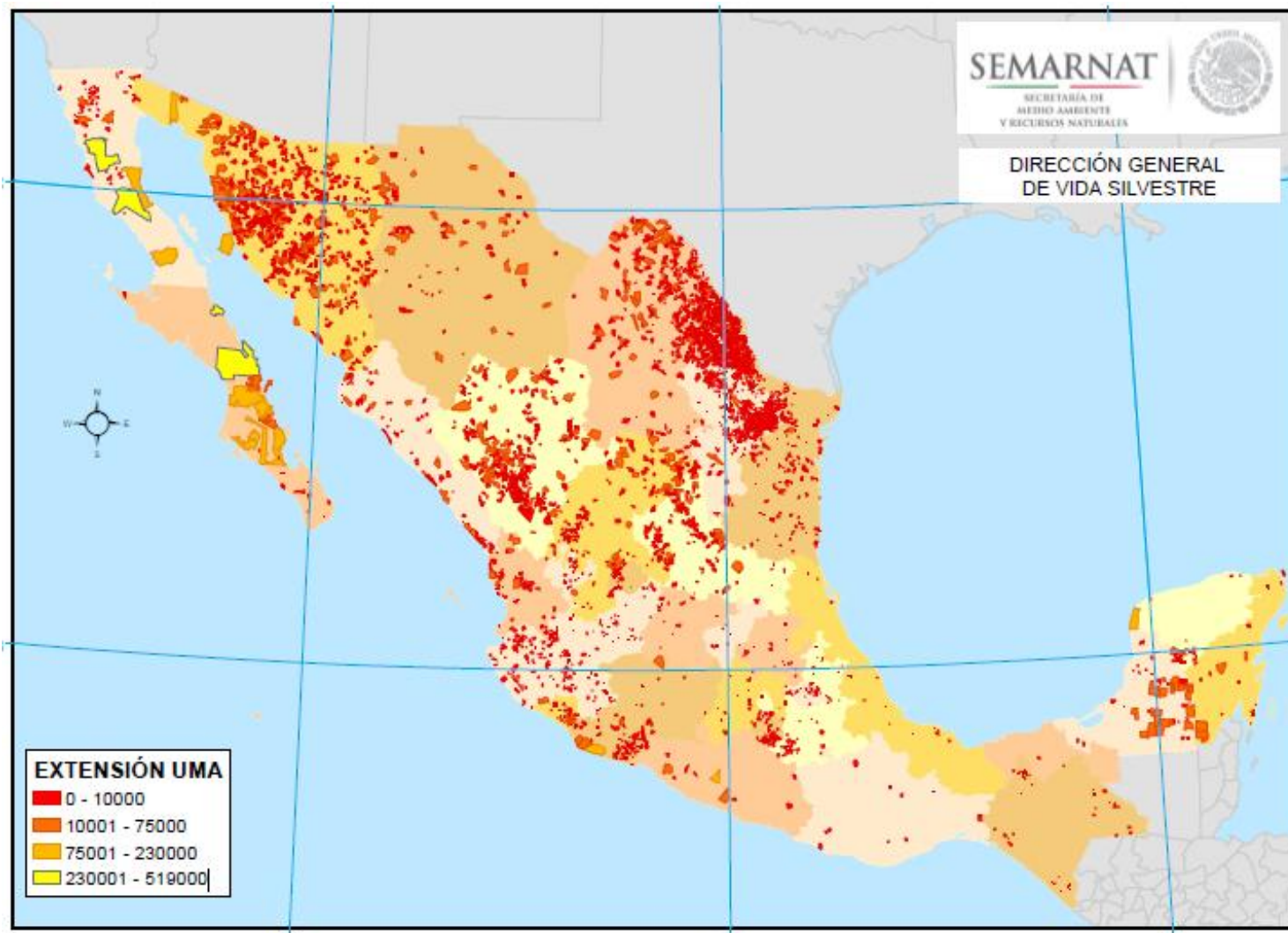


Figura 3. Localización de las UMA´s extensivas e intensivas registradas hasta Julio 2013 (Documento disponible en Internet http://www.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/vidasilvestre/Documents/sistemavs/Mapa_UMA_150913.pdf).

2.3. *Neospora caninum*

Fue reconocida por primera vez en Noruega en 1984 en cachorros que presentaban signos nerviosos (Bjerkas et al., 1984) y descrita como un nuevo género y especie en 1988 (Dubey et al., 1988). El primer reporte de abortos asociados a *N. caninum* se realizó en Nuevo México a finales de la misma década (Thilsted et al., 1989).

Neosporosis afecta a perros y ganado bovino y también es causa de enfermedad en ovejas, cabras, caballos y venados. La infección con *N. caninum* es una de las principales causas de aborto en vacas alrededor del mundo (Georgieva et al., 2006). La disminución de la productividad, causada por la patología reproductiva de la enfermedad, es causa de pérdidas económicas estimadas en millones de dólares.

2.3.1. Características biológicas y taxonómicas.

Es un protozoario perteneciente al phylum *Apicomplexa*, familia *Sarcocystidae*, a la que también pertenecen *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis auchenicaris*, *Hammondia heydorni* y *Hammondia hammondi*. Su ciclo de vida involucra a dos hospedadores. Los perros domésticos y cánidos silvestres (Gondim et al., 2004b; King et al., 2010; Dubey et al., 2011) han sido descritos como hospedadores definitivos (HD), y herbívoros domésticos y salvajes, así como también los mismos HD juegan el rol de hospedadores intermediarios (HI). Dentro del ciclo de vida se reconocen tres etapas infectantes: taquizoitos, quistes tisulares que contienen a los bradizoitos y los ooquistes. Los quistes tisulares poseen una forma ovalada o redondeada, pueden medir alrededor de 100µm

y su pared tiene un grosor de 4µm, se han encontrado en cerebro, medula espinal y en la retina de HI; dentro de estos quistes se encuentran los bradizoitos los cuales miden entre 7-8 µm de largo y 2 µm de ancho. Los taquizoitos miden alrededor de 6 µm de largo y 2 µm de ancho. En hospedadores intermediarios infectados se pueden encontrar células nerviosas, fibroblastos, células endoteliales vasculares, miocitos y hepatocitos. Los ooquistes tienen una forma esférica y poseen un diámetro aproximado de 11 µm estos se encuentran en las heces de los HD. Los ooquistes esporularán en el ambiente y se volverán infectantes para el HI (Georgieva et al., 2006).

2.3.1.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de este parasito es indirecto, ya que ocurre entre los HD y los HI. El HD se infecta al ingerir membranas fetales, placenta y órganos de fetos abortados que contienen taquizoitos o quistes tisulares (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 2001). La reproducción sexual comienza en el tracto intestinal del canino, para posteriormente excretar junto con las heces los ooquistes no esporulados, esto ocurre en un periodo entre 5 a 17 días después de la infección; los ooquistes esporulan después de 3 días de estar en el ambiente. Cada Ooquiste esporulado contiene 2 esporoquistes con 4 esporozoitos en cada uno. Los ooquistes esporulados contaminan el agua y el alimento que ingiere el HI y una vez en el intestino los esporozoitos son liberados penetrando en las células de la mucosa intestinal transformándose en taquizoitos, los cuales se replican rápidamente por endodiogenia en las células huésped y después de su destrucción son liberados, invaden vía linfática y sanguínea diferentes órganos, encontrándose en tejido nervioso, macrófagos, fibroblastos, células

endoteliales, células musculares y placeta. Los taquizoitos que se transmiten vía trasplacentaria producen abortos, mortinatos, así como el nacimiento de crías afectadas o sin signos aparentes de la infección pero portadores. Los taquizoitos que se encuentran en el tejido diana pueden transformarse a bradizoitos cuando una poderosa respuesta inmune contra el protozoo está presente en el área, formándose a su alrededor los quistes tisulares dentro de los cuales permanecen en un estado latente. En estados de inmunosupresión del HI los bradizoitos pueden reactivarse (Dubey et al., 1999; Georgieva et al., 2006). Cuando el HD consume los tejidos que contienen los quistes tisulares o los taquizoitos, se habrá completado el ciclo.

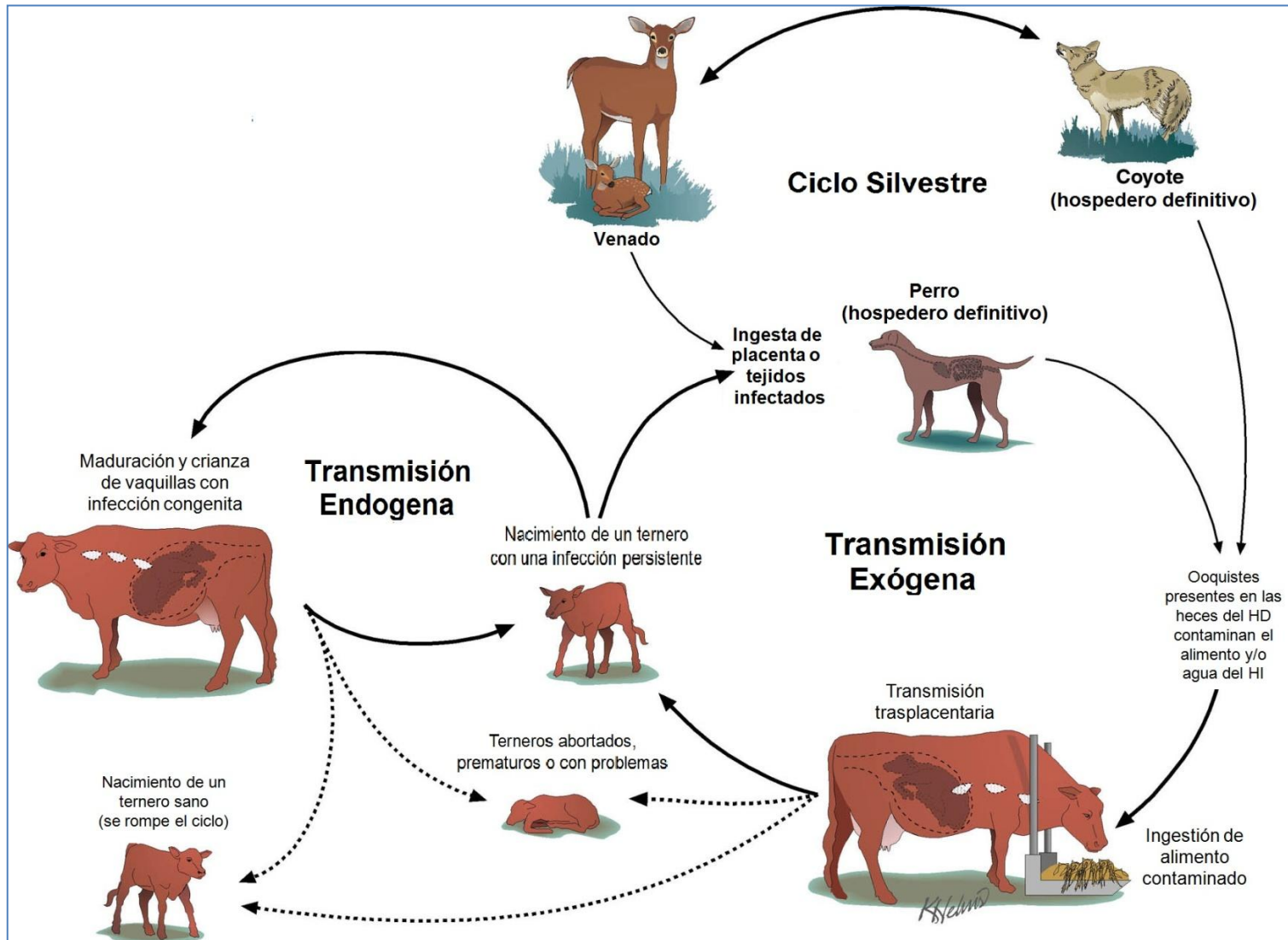


Figura 4. Ciclo de vida de *Neospora caninum* y la interacción entre los ciclos silvestre y doméstico. (Adaptación de McAllister; documento disponible en internet)

2.3.2. Epidemiología

2.3.2.1. Transmisión

N. caninum puede ser transmitido horizontalmente mediante la ingestión de tejidos infectados con taquizoitos o quistes tisulares, o la ingestión de alimento o agua contaminada por ooquistes esporulados; o puede ser transmitido verticalmente de una madre a su feto durante la gestación. Recientemente se han propuesto los términos “transmisión trasplacentaria exógena” y “transmisión trasplacentaria endógena” para describir con más precisión el origen de la infección trasplacentaria (Trees et al., 2005). La transmisión trasplacentaria exógena ocurre después de una infección primaria durante la preñez; mientras que la transmisión trasplacentaria endógena ocurre cuando en una madre persistentemente infectada hay una reactivación de la infección durante la gestación. La probabilidad de transmisión vertical en hatos con infección latente se incrementa de un 81 al 100% a partir de la semana 20 de gestación; otro aspecto importante es el hecho de que las madres infectadas pueden producir a lo largo de su vida descendencia con la misma condición (Haddad et al., 2005). La ingesta de ooquistes es la única causa de transmisión horizontal en herbívoros.

2.3.2.2. Prevalencia

N. caninum es un protozoario que se reportó originalmente en perros y terneros (Bjerkas et al., 1984; Parish et al., 1987; Dubey et al., 1988) y se ha diagnosticado mundialmente como causa común de abortos en bovinos (Dubey et al., 1999). El parásito ha sido detectado en varias especies de mamíferos, como cabras, ovejas,

caballos, venados, búfalos de agua y zorros (Dubey & Lindsay et al., 1996; Guarino et al., 2000; Almeria et al., 2002). Se ha demostrado que los perros y los coyotes son los HD del parásito (McAllister et al., 1998; Gondim et al., 2004b). Hay pocos casos confirmados de neosporosis en animales silvestres; sin embargo, se han reportado seroprevalencias en una gran variedad de especies de mamíferos silvestres, lo que sugiere que el parásito está ampliamente distribuido entre la vida silvestre (Dubey et al., 2007). Se han reportado casos de neosporosis en diferentes especies de venados silvestres (Woods et al., 1994; Dubey et al., 1996a). Así como también se ha demostrado que el parásito puede ser transmitido del venado a animales domésticos (Gondim et al., 2004a) Se ha encontrado una seroprevalencia de este protozoario en venado cola blanca en libertad en Estados Unidos de América entre 30- 50% (Dubey et al., 1999a; Lindsay et al., 2002; Anderson et al., 2007) lo que sugiere que el venado cola blanca puede jugar un papel importante en la epidemiología de la enfermedad.

Cuadro 1. Seroprevalencias de *N. caninum* reportadas en estudios realizados en el Noreste de México en ganado bovino y en el venado cola blanca.

Tipo de manejo	Muestras		Seroprevalencia	Referencia
	Total	Positivas		
Extensivo				
Ganado bovino	1073	124	11.6%	Domínguez-Díaz, 2009.
Venado cola blanca	368	31	8.4%	Olamendi-Portugal et al., 2012.
Intensivo o semi-intensivo				
Ganado bovino	591	211	35.7%	Salinas-Meléndez et al., 2005.
Venado cola blanca	175	47	26.9%	<i>Resultados del presente estudio.</i>

2.3.2.3. Factores de riesgo

En estudios epidemiológicos realizados en explotaciones de ganado bovino, la presencia de cánidos dentro de la explotación, así como el número de ellos incrementa el riesgo de seropositividad en el ganado (Paré et al., 1998; Corbellini et al., 2006; Schares et al., 2004). Otros factores como la disposición adecuada de los desechos del parto así como de los productos abortados, es importante para evitar que los HD ingieran los desechos infectados ya que esto propicia la diseminación del parásito dentro de la explotación (Domínguez-Díaz , 2009; Dijkstra et al., 2002). La convivencia del ganado con otros hospedadores intermediarios (ovejas, cabras, roedores), pueden ser una fuente de infección para hospederos definitivos (Coberllini et al., 2005). Otro factor de riesgo importante son las fuentes de agua, el forraje y pastizales contaminados con ooquistes ya que se consideran potenciales fuentes de infección horizontal entre el ganado (Dubey et al., 2007). En estudios realizados en ganado bovino de los Estados Unidos de América, se ha encontrado que altas densidades poblacionales son un factor de riesgo de infección del parásito (Barling et al., 2000,2001; Sanderson et al., 2000). En otro estudio se encontró que a mayor tamaño de las tierras agrícolas, la seroprevalencia en los hatos disminuyó (Coberllini et al., 2005). Desafortunadamente, la información sobre las condiciones climáticas en la que los ooquistes de *N. caninum* sobreviven, es rara. En estudios europeos donde se analizaron los efectos del clima como riesgo de seropositividad en ganado bovino, se reportó que los factores de temperatura media en la estación primavera-verano fueron identificados como factores de riesgo (Rinaldi et al., 2005; Schares et al., 2004). Lo que

se puede explicar por los efectos del clima en la esporulación de los ooquistes. Por ejemplo, una temperatura más alta puede favorecer una rápida esporulación de los ooquistes en el medio ambiente (Dubey et al., 2007).

2.3.3. Patogenia

Se ha reportado que después de una inoculación intraperitoneal experimental, los taquizoitos se pueden encontrar en sangre, bazo, hígado y pulmones entre 2-5 días después de la inoculación; la presencia del parasito en sangre puede disminuir y probablemente se vuelva a encontrar después del día 19, sin embargo en ganglio linfático se puede encontrar intermitentemente. En cerebro y pulmón se puede encontrar hasta el día 7, pero conforme avanza el tiempo disminuye su presencia en pulmón y se incrementa en el tejido cerebral donde se evidencia una marcada encefalitis. El parasito puede atravesar la placenta e infectar al feto, lo que puede provocar el aborto del mismo; a nivel de placenta se produce un proceso inflamatorio agudo con necrosis focal, la cual afecta la interfase materno-fetal. El aborto también dependerá de cuando se presenta la infección o en el caso de ser una transmisión trasplacentaria endógena, dependerá de la capacidad del feto para montar una respuesta inmune frente al parasito, en los rumiantes el sistema inmunológico está capacitado a partir de los 130 días de gestación aproximadamente. La invasión del feto por parte del parasito puede dar como resultado abortos, nacimiento de crías con afecciones nerviosas severas o animales aparentemente sanos pero infectados congénitamente (Innes et al., 2005; Dubey., 1999a).

2.3.4. Diagnóstico

La detección de anticuerpos contra *N. caninum* en el suero de animales afectados solo nos indica la exposición al patógeno por lo cual es necesario su análisis histológico para el diagnóstico definitivo a neosporosis. Para la realización de la histopatología se pueden utilizar muestras de tejido fetal como cerebro, hígado, bazo, corazón y músculo esquelético, así como también la placenta. Aunque las lesiones se pueden encontrar en distintos órganos, el cerebro es el más frecuentemente afectado. Las lesiones encontradas más frecuentemente son una encefalitis focal caracterizada por necrosis e inflamación no supurativa, miocarditis no supurativa, miositis focal no supurativa y necrosis focal hepática. La inmunohistoquímica es de gran utilidad en situaciones en las que no se puede tomar una muestra de tejido de calidad. Las pruebas serológicas más utilizadas para la detección de anticuerpos contra *N. caninum* son la de inmunofluorescencia indirecta (IFA), prueba de aglutinación directa (DAT) y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). De estos últimos existen diferentes variedades de procedimientos, aunque la mayoría están basadas en el uso de taquizoitos de *N. caninum* aislados de bovinos o cánidos. Se han realizado modificaciones para mejorar la sensibilidad y especificidad de estas pruebas, de las cuales el formato de ELISA de competencia ha demostrado tener una buena sensibilidad y especificidad, ya que utiliza anticuerpos monoclonales que se unen a un antígeno de superficie inmunodominante del taquizoito. El PCR se ha utilizado en sangre periférica, en productos abortados y sus tejidos así como el tejido placentario, esta prueba se ha comparado con histopatología encontrándose que la ausencia de lesiones al realizar la histopatología

no indica la ausencia del parásito en el tejido, por lo que el PCR resulta ser más específico ya que detecta el material genético del parásito (Dubey & Lindsay, 1996; Anderson et al., 2000; Baszler et al., 2001).

2.4. Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)

La diarrea viral bovina es una enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones de ganado bovino, la cual ha sido detectada en diversas especies de bóvidos y cérvidos. Este virus puede ocasionar infecciones subclínicas, así como también puede provocar defectos congénitos, enteritis, infecciones persistentes, enfermedad de las mucosas y trastornos reproductivos, siendo de mayor importancia estos últimos, debido al impacto económico que tiene en las producciones (Deregt et al., 1995).

2.4.1. Características biológicas y taxonómicas

El VDVB pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. Son virus envueltos y de forma esférica los cuales miden 40-60 nm de diámetro. Está compuesto de una cadena simple de ARN compactado en un cápside proteica, rodeada por una membrana fosfolipídica con tres glicoproteínas ancladas a ella. La principal característica de este virus es su variabilidad genética y antigénica. Su plasticidad le ayuda a sobrevivir, originando cepas mutantes que escapan a la respuesta inmunológica del hospedero. El cruce de especies crea otra oportunidad para la diversificación, ya sea por adaptación al nuevo hospedero o por evolución divergente. Sin embargo, sigue conservando ciertas características biológicas y antigénicas.

También se ha demostrado que nuevas variantes antigénicas se originan durante el pasaje del virus en bovinos susceptibles que desarrollan una infección aguda. Se clasifican en VDVB-1 y VDVB-2; debido a diferencias genéticas que están directamente involucradas con la capacidad antigénica, dividiéndose VDVB-1 en al menos 11 genogrupos y 3 para el VDVB-2. Según sus efectos en los cultivos celulares se pueden dividir en biotipos citopáticos (CP) y no citopáticos (NCP). Los virus CP provocan una vacuolización y muerte celular, mientras que las NCP no ocasionan cambios visibles en el cultivo celular y la célula infectada parece normal (Nettleton et al., 1995; Létora et al., 2003; Ridpath et al., 2003).

2.4.2. Epidemiología

2.4.2.1. Transmisión

La transmisión puede darse horizontal o verticalmente, por contacto directo o indirecto. En la infección de un animal gestante y no inmune, el virus cruza vía trasplacentaria e invade el feto, lo cual puede resultar en un amplio rango de anomalías; como muerte fetal, defectos congénitos o animales persistentemente infectados (PI) sin signos clínicos aparentes. El resultado de la infección depende principalmente del estado de desarrollo del feto en el momento de la infección. Si el feto es infectado por biotipos NCP antes de desarrollar competencia inmunológica adecuada presentará una infección persistente. El contacto directo con animales PI o con animales que cursan una infección aguda, especialmente nariz-nariz, es el modo más eficiente de transmitir el virus en condiciones naturales. El VDVB también puede ser

transmitido en semen, particularmente de toros PI, los cuales transmitirán el virus el resto de sus vidas (Houe, 1995; Létora, 2003; Lindberg, 2003). Se ha demostrado que el virus puede ser transmitido horizontalmente entre cérvidos al tener contacto directo con un cervato PI (Passler et al., 2010). También en estudios realizados en venado cola blanca, se ha reportado que al interactuar venadas gestantes con bovinos PI puede ocurrir la transmisión horizontal del virus provocando la infección de las venadas, las cuales transmitirán verticalmente el virus dando como resultado un cervato PI (Passler et al., 2009).

2.4.2.2. Prevalencia

Esta enfermedad se distribuye mundialmente y la infección tiende a ser endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas (Haigh et al., 2002). Se ha reportado en la mayoría de los países niveles de bovinos persistentemente infectados (PI) entre 0.5-2% y una seroprevalencia en bovinos de 60 a 80% (Houe, 1999).

El orden *Artiodactyla* consiste en 10 familias, y se ha encontrado evidencia de infección con el VDVB en las familias Antilocapridae, Bovidae, Camelidae, Cervidae, Giraffidae, Suidae, y Tragulidae, las cuales incluyen más de 50 especies, entre ellas el venado cola blanca. En estudios epidemiológicos realizados en esta especie en Estados Unidos de América, se han observado seroprevalencias que varían 0.3 a 46% (Aguirre et al., 1995; Pogranichniy et al., 2008; Wolf et al., 2008). En el noreste de México, se observó una seroprevalencia de 64% en poblaciones de venado cola blanca;

así como también se reportó una prevalencia de anticuerpos contra VDVB en cérvidos exóticos del 24% (Cantú et al., 2008; Bautista-Piña, 2011).

2.4.2.3. Factores de riesgo

Se ha concluido mediante varios estudios que muchas especies de rumiantes silvestres pueden ser infectadas con el VDVB y servir como potenciales reservorios de infección para las poblaciones de ganado. En estudios realizados en poblaciones de venado cola blanca, se ha encontrado que a una menor densidad poblacional mayor seroprevalencia del virus dentro de la región, así como también en explotaciones donde están presentes el ganado bovino y los venados se asocia una mayor prevalencia de anticuerpos contra VDVB que en explotaciones en las cuales no hay esta interacción (Cantú et al., 2008). Otro factor de riesgo importante en las producciones ganaderas es la presencia de animales PI, donde se ha observado mayor prevalencia de anticuerpos frente al virus en hatos donde se encuentra un animal PI comparado con los hatos donde no se ha identificado la presencia de dichos animales (Houe, 1995). En venado cola blanca se ha logrado evidenciar la presencia de animales PI, la posibilidad de una transmisión horizontal por la interacción con animales PI (ya sean con bovinos o venados) y el nacimiento de un cervato PI como consecuencia de una infección de la madre durante la gestación debido a dicha interacción (Passler et al., 2009; 2010). No se ha encontrado evidencia literaria que establezca la presencia de venados PI como factor de riesgo de infección dentro de las mismas poblaciones de venados, pero debido a la importancia como medio de transmisión del patógeno y a los resultados observados en otras especies, se puede asumir que la presencia de venados PI, puede

ser un factor de riesgo importante dentro de las mismas poblaciones. En explotaciones de ganado bovino, el sistema de producción se ha descrito como un factor de riesgo, encontrándose una seroprevalencia alta de anticuerpos contra VDVB en producciones extensivas comparada con las producciones intensivas, lo que responde según autores a la movilización de animales (introducción) que puede haber en hatos con sistemas extensivos, lo que no ocurre tan frecuentemente en un sistema intensivo, aunque en este último ocurre un mayor contacto directo entre individuos lo que incrementa las probabilidades de contagio (Houe, 2005).

2.4.3. Patogenia

Después del ingreso del virus por contacto con las membranas mucosas de la boca o nariz, la replicación ocurre en células epiteliales con una predilección por las tonsilas palatinas, especialmente células epiteliales de la cripta. El virus presenta tropismo por células mitóticamente activas como linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales. Se cree que la cepa CP se replica en la mucosa nasal en una mayor titulación que la NCP. La replicación comienza con la adhesión a la membrana plasmática y la posterior penetración en la célula, mediada por la proteína de envoltura E2. Además, ocurre una fusión de la envoltura con la membrana endosomal y el virus ingresa al citoplasma mediante endocitosis mediada por receptor y liberando su genoma en el citosol. La diseminación del virus ocurre mediante partículas virales libres en el suero o leucocitos infectados con el virus, particularmente linfocitos, monocitos, linfoblastos circulantes y células precursoras de macrófagos. El virus viaja por vía linfática infectando los nódulos linfáticos de todos los sistemas y se dirige a demás

órganos linfáticos como el timo en animales jóvenes, el bazo, las placas de Peyer en el intestino delgado; la infección de médula ósea origina una linfopenia y trombocitopenia. La forma aguda se presenta en animales seronegativos, especialmente entre los 6 y 24 meses de edad, y es causada principalmente por el virus NCP, puede afectar el sistema inmune y respiratorio, resultado de la difusión activa del virus. Es común la presentación de infecciones secundarias o mixtas con otros patógenos. La afección severa de los sistemas dependerá de la virulencia y el genotipo del virus, la presentación de infecciones secundarias por otros patógenos, la edad, el estado inmunológico y la condición corporal del hospedador (Brownlie et al., 1987; Létora, 2003; Rondón, 2006).

2.4.4. Diagnóstico

La prueba de seroneutralización ha sido la prueba estándar para la detección y titulación de anticuerpos contra VDVB, también se pueden utilizar pruebas ELISA para la detección de anticuerpos o antígeno del virus, las cuales son rápidas y una alternativa económica. Para la identificación de la presencia del virus, se puede realizar el aislamiento del mismo, así como también se pueden utilizar pruebas moleculares como el RT-PCR para la detección de material genético del patógeno. Para el diagnóstico post-mortem de diarrea viral bovina se deben incluir hallazgos de lesiones macroscópicas e histológicas con el aislamiento del virus o la detección del VDVB mediante RT-PCR o inmunohistoquímica. El aislamiento del virus puede ser realizado de diversos tejidos, particularmente tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal. También se pueden utilizar muestras de piel de ganado vivo o muerto para la identificación del virus (Deregt et al., 1995; Létora., 2003; Manual OIE, 2008). En un

estudio realizado para evaluar la distribución del antígeno de VDVB en un venado cola blanca PI, se encontró que en los sistemas hepatobiliar, tegumentario y reproductivo se tiene una mayor probabilidad de encontrar el antígeno que en el sistema músculo esquelético; así también se observó un pronunciado conteo en el tejido epitelial, el cual era 1.9-3.0 veces más probable de contener el antígeno de VDVB que en cualquier otro tejido. La distribución del antígeno en venado PI es similar a la de un bovino PI (Passler et al., 2012).

2.5. *Leptospira spp.*

La leptospirosis es causada por distintas variedades serológicas (serovariedades) de la bacteria del género *Leptospira*. En todo el mundo, un gran número de serovariedades son transmitidas por una restringida gama de reservorios, que a menudo son roedores, pero también incluyen otras especies de animales domésticos y silvestres. Esta enfermedad puede afectar a una amplia gama de especies de mamíferos, incluyendo a los venados. La infección es a menudo asintomática pero puede desarrollarse como una enfermedad grave, incluyendo el aborto, hemoglobinuria, ictericia y nefritis (Mackintosh et al., 2002). Leptospirosis es una de las infecciones zoonóticas más comunes y temidas alrededor del mundo, por lo cual es de gran importancia para salud pública y la producción pecuaria.

2.5.1. Características biológicas y taxonómicas

Son bacterias gram negativas, pertenecientes a la familia *Leptospiraceae*, orden *Spirochaetales*, poseen una forma delgada y helicoidal con una longitud entre 10-20

µm. La composición de lipopolisacáridos es similar a otras bacterias gram negativas, pero tienen baja actividad endotóxica. Son bacterias aerobias y microaerófilas móviles con un crecimiento óptimo en temperaturas entre los 28 a 30°C y rangos de pH entre 7.2 y 7.6; el medio donde crecen debe ser enriquecido con vitaminas B₂ y B₁₂, ácidos grasos y sales de amonio. Tradicionalmente el género *Leptospira* se divide en dos grandes especies: *L. interrogans* patógena y *L. biflexa* que habita en el medio, esta clasificación taxonómica obedece a diferencias antigénicas observadas en pruebas de aglutinación, teniendo que, las leptospiras patógenas se dividen en más de 200 serovariedades que integran 25 grupos serológicos; y 60 serovariedades pertenecientes a la especie *L. biflexa*. Se han identificado 16 especies genómicas de leptospiras patógenas, por su similitud genética entre los aislados, pero desde un punto de vista epidemiológico y clínico es más práctico utilizar la clasificación basada en diferencias serológicas (Levett et al., 2001; Adler et al., 2004).

2.5.2. Epidemiología

2.5.2.1. Transmisión

Reservorios de serovariedades de *Leptospira spp* desarrollan una nefritis intersticial crónica liberando leptospiras en orina por periodos largos de tiempo. Huéspedes accidentales arrojan el organismo por un periodo más corto. Se ha reportado que el ciervo rojo puede presentar una fase de leptospinuria hasta por 8 meses. *Leptospira* no se multiplica fuera del huésped pero puede persistir en el ambiente por largos periodos de tiempo bajo condiciones húmedas y frescas, logrando

sobrevivir hasta 180 días en suelos húmedos, y por varios meses en superficies acuosas y en agua estancada. Los animales son infectados principalmente al exponerse a orina, agua y alimento contaminado; los organismos atraviesan la membrana mucosa, especialmente la conjuntiva, o a través de heridas en la piel (Adler et al., 2004).

2.5.2.2. Prevalencia

Debido a su cercanía con el ganado doméstico se han realizado diversos estudios serológicos para determinar la prevalencia de *Leptospira spp* en poblaciones de cérvidos en Norteamérica. En el estado de Minnesota, Estados Unidos de América, se reportó una presencia de anticuerpos en venado cola blanca en el 43% de las muestras de suero analizadas, también se encontró que las serovariedades *L. pomona* y *L. bratislava* fueron las predominantes en las poblaciones estudiadas (Goyal et al., 1992). En otro estudio realizado en la zona sur de mismo estado, se encontró una prevalencia estimada en 19% menor a lo reportado en estudios anteriores y observándose las serovariedades *L. grippotyphosa*, *L. pomona* y *L. bratislava* (Wolf et al., 2008). También se ha reportado evidencia serológica de este patógeno en otros cérvidos (venado bura (*Odocoileus hemionus*) y wapití (*Cervus canadensis*), observándose una baja prevalencia de las serovariedades *L. pomona* y *L. hardjo* (Aguirre et al., 1995). En México se ha encontrado una prevalencia de 5.5% para *Leptospira interrogans* en venado cola blanca del noreste del país (Cantú et al., 2008), y en cérvidos exóticos (*Axis axis* y *Dama dama*) se observó una prevalencia de 13.5% donde las serovariedades observadas fueron *L. bratislava* y *L. muenchen* (Bautista,

2011). En Nueva Zelanda, las serovariedades *L. pomona*, *L. hardjo* y *L. copenhageni* han sido aislados de ciervos de granja clínicamente afectados (Mackintosh et al., 2002). En el **Cuadro 2** se muestran que especies domésticas se asocian a las serovariedades tomadas en cuenta en el presente estudio.

Cuadro 2. Reservorios de las serovariedades analizadas en el presente estudio. (Vado-Solís et al., 2002; Spickler, 2005)

Serovariedad	Reservorios
<i>L. bratislava</i>	Cerdos, roedores y bovinos
<i>L. canicola</i>	Perros
<i>L. grippotyphosa</i>	Perros, bovinos y cerdos
<i>L. hardjo</i>	Bovinos, ovejas, cabras, caballos y cerdos
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	Roedores y cerdos
<i>L. pomona</i>	Bovinos, ovejas, cabras, caballos y cerdos
<i>L. pyrogenes</i>	Perros y cerdos
<i>L. tarassovi</i>	Bovinos y cerdos
<i>L. wolffi</i>	Bovinos y cerdos

2.5.2.3. Factores de riesgo

Debido a que un gran número de serovariedades afectan a ciertas especies y también son transmitidas por un rango restringido de reservorios, generalmente roedores pero también animales silvestres y domésticos, el contacto e interacción con ellos es un factor de riesgo para la transmisión de la enfermedad. Para la transmisión de *L. bratislava* se ha asociado la convivencia de bovinos con cerdos, caballos, perros y roedores silvestres (*Apodemus sylvaticus*) (Van der Broek et al., 1991); así como también la interacción del ganado bovino con especies porcinas domésticas y silvestres

está asociada a la transmisión de *L. tarassovi* y *L. pomona* (Rocha et al., 1998). En un estudio realizado en el noreste de México, se encontró una asociación entre la seropositividad a leptospirosis con el tipo de pastoreo utilizado, en el cual se observó que los venados al coexistir con el ganado bovino en condiciones de pastoreo continuo, tienen 3.6 veces más probabilidades de ser seropositivos a la prueba; esto se puede deber a que los venados y el ganado comparten la misma región y a la constante contaminación de los pastizales y fuentes de agua por ambas especies (Cantú et al., 2008).

2.5.3. Patogenia

La bacteria entra a través de las membranas mucosas, de la conjuntiva o abrasiones y cortes en la piel; la transmisión por agua es posible, se ha documentado que la contaminación de los suministros de agua puede resultar en brotes de leptospirosis. La inhalación de agua o los aerosoles también puede resultar en una infección a través de las membranas mucosas del tracto respiratorio. Cuando las leptospiras están en el cuerpo, se produce una leptospiremia y esta puede durar hasta que se presente una respuesta inmuno-específica. *Leptospira spp.* son parásitos extracelulares y su lesión más distintiva es la vasculitis. Hemorragias petequiales en las membranas mucosas son comunes y se producen durante la fase septicémica. Las lesiones de los tejidos diana son causadas por toxinas que produce la bacteria, entre ellas hemolisinas, esfingomielininas, fosfolipasas, actividad citotóxica, producción de inhibidores de la bomba de sodio y potasio y la producción de proteínas promotoras de poros en las membranas celulares. Después de producirse el efecto de dichas toxinas,

ocurre una gran movilización de células fagocíticas que arrestan a la bacteria para su destrucción, sin embargo, la gran mayoría de las serovariedades poseen un componente antifagocítico por lo que resiste el ataque de los neutrófilos y además el componente LPS de sus membranas promueve la adherencia de los neutrófilos y plaquetas a las células endoteliales, provocando una trombocitopenia y adherencias a las paredes vasculares, en ese momento hay una alta circulación de anticuerpos en el torrente sanguíneo, lo que origina complejos inmunes que son secuestrados en vasos sanguíneos estrechos de diferentes órganos, montándose una respuesta inmune muy agresiva, por lo que los tejidos adyacentes al sitio afectado también sufre graves consecuencias. Debido a lo anterior, en la forma aguda de leptospirosis se puede presentar hemólisis, trombocitopenia, ictericia, esplenomegalia, hepatitis, hemoglobinuria, nefritis intersticial aguda, aborto o infertilidad, uveítis autoinmune y meningitis hemorrágica, acompañada a menudo por muerte súbita. La forma crónica de la infección sucede cuando la bacteria se adhiere a las células epiteliales renales y dentro de este órgano hay una producción elevada de bacterias por la falta de una respuesta inmune humoral, ya que el órgano es un sitio privilegiado para el sistema inmune y de esta forma la bacteria se excreta a través de la orina por largos periodos de tiempo. (Adler et al., 2004; Levett et al., 2001)

2.5.4. Diagnóstico

El diagnóstico en base en hallazgos clínicos puede ser difícil a menos que signos obvios de la enfermedad estén presentes como ictericia o hemoglobinuria. La combinación del análisis de orina mediante microscopia con campo oscuro, el cultivo de

orina y/o tejidos (preferentemente de riñón) y técnicas de inmunofluorescencia, son consideradas importantes para la confirmación de la enfermedad. Existen diferentes pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *Leptospira spp.*, siendo la más utilizada la prueba de microaglutinación en placa (“Microscopic Agglutination Test”, MAT), considerada la prueba estándar para el diagnóstico serológico de esta enfermedad, la cual es una prueba con gran sensibilidad y a su vez puede establecer el diagnóstico de diferentes serovariedades en una misma muestra; las limitantes de esta prueba es el riesgo biológico para el operario de la técnica, debido al uso de suspensiones de bacterias vivas o atenuadas y la necesidad de una preparación continua de la suspensión para mantener vivas a las bacterias, por lo cual el operario debe ser una persona calificada para la realización adecuada de la técnica, pues se requieren una serie de diluciones así como la observación de la aglutinación bajo el microscopio. Otras pruebas serológicas que pueden utilizarse son la prueba de aglutinación en látex la cual debe realizarse en los primeros 10 días después de la infección si no la especificidad y sensibilidad disminuirán, esta prueba nos proporciona un diagnóstico clínico rápido; las pruebas ELISA detectan anticuerpos IgM específicos contra leptospira presentando una alta sensibilidad y especificidad; así como también se pueden utilizar técnicas moleculares como el PCR la cual nos proporciona una detección rápida del material genético de *Leptospira* y posee una mayor sensibilidad y especificidad que métodos convencionales (Merien et al., 1995; Levett et al., 2001).

2.6. *Brucella abortus*

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de gran importancia y distribuida mundialmente en humanos y animales, que a pesar de ser conocida desde hace muchos años, continúa siendo un problema sanitario y económico de gran importancia. La frecuencia de la enfermedad en los seres humanos depende en gran medida de la aparición de la brucelosis en reservorios animales, incluyendo a los animales silvestres. La diversidad de los animales portadores de la bacteria responsable complica la lucha contra esta infección, especialmente las preventivas, ya que no existe un panorama real de su prevalencia ni de los vectores involucrados en su diseminación. No obstante los animales que son reconocidos como portadores de esta enfermedad tienen, en muchos casos, íntimo contacto con el hombre, y tomando en cuenta las vías de infección conocidas, se explica la importancia e impacto de esta zoonosis (Castro et al., 2005).

2.6.1. Características biológicas y taxonómicas

El género *Brucella* son cocobacilos o bacilos gram-negativos pequeños (0.5-0.7 μm por 0.6-1.5 μm), inmóviles e intracelulares facultativos, de crecimiento lento que no poseen cápsulas ni forman esporas. Tiene un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivas y en general no fermentadoras de azúcares. Se reconocen seis especies dentro del género *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*. Esta clasificación está basada principalmente en la patogenicidad y por su preferencia hacia ciertos hospederos. Las especies patogénicas de mayor importancia alrededor del

mundo son *B. abortus* (responsable de la brucelosis bovina), *B. melitensis* (agente etiológico de brucelosis caprina y ovina), y *B. suis* (principal causa de brucelosis en cerdos). En base al aspecto de colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican en lisas, que incluyen *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae*; o rugosas, *B. ovis* y *B. canis*. Esta diferenciación en el aspecto de las colonias se debe a la expresión del lipopolisacárido LPS en la superficie de la bacteria. Las cepas de *Brucella* más virulentas son las que se encuentran en la fase lisa y poseen semejanza a la estructura de algunas bacterias gram-negativas (*Yersinia enterocolítica*, *Escherichia hermanni*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*), aunque presenta diferencias en las características de la membrana externa (Castro et al., 2005; Godgroid, 2002).

2.6.2. Epidemiología

2.6.2.1. Transmisión

Brucella spp son altamente infeccioso, la fuente de infección la constituyen los animales infectados que excretan una gran cantidad de bacterias junto con los tejidos y productos de abortos, en la leche y en secreciones genitales, contaminando suelos, corrales, en las pajas de las camas agua de arroyos, canales y pozos; la bacteria puede sobrevivir en el ambiente por periodos largos de tiempo. Al ingresar la bacteria en el organismo, a través de la mucosa oral, nasal, conjuntival o vaginal, esta se puede localizar en nódulos linfáticos locales y diseminarse hacia otros tejidos linfoides o rutas hematógenas. *Brucella abortus* tiene una alta predilección por úteros gestantes,

glándulas mamarias, testículos, nódulos linfáticos y capsulas articulares. Los úteros no gestantes generalmente no se ven afectados por *Brucella abortus* (Mackintosh et al., 2002; Castro et al., 2005).

2.6.2.2. Prevalencia

La mayoría de las especies de *Brucella* se asocian a hospederos determinados; no obstante, pueden infectar a otras especies, especialmente cuando se les mantiene en un contacto estrecho. Los reservorios de *Brucella abortus* incluyen al ganado bovino, al bisonte (*Bison bison*), el búfalo de agua (*Bubalus bubalus*), el búfalo cafre (*Syncerus caffer*), el wapití y el camello. *Brucella abortus* y *B. suis* se han aislado alrededor del mundo en una gran variedad de animales silvestres, como el bisonte, ciervo rojo (*Cervus elaphus*), jabalíes (*Sus scrofa*), liebre europea (*Lepus capensis*), zorros (*Vulpes vulpes*), búfalo africano (*Syncerus caffer*), antílope eland común (*Taurotragus oryx*), antílope acuático (*Kobus ellipsiprymnus*), reno (*Rangifer tarandus tarandus*), y caribú (*Rangifer tarandus groenlandicus*) (Mackintosh et al., 2002; Godfroid, 2002).

En distintos estudios serológicos realizados en Estados Unidos de América, se han reportado prevalencias menores de un 1% en poblaciones de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y venado bura (*Odocoileus hemionus*) (Moore et al., 1981; Tessaro, 1986). En Missouri, de un total 713 muestras de venado cola blanca, una resulto positiva a la prueba, dicha muestra provenía de una granja en cuarentena (Jones et al., 1983); así como también, *B. abortus* fue aislada de una muestra de venado cola blanca de un total de 70 muestras. En estudios realizados en México, no

se ha encontrado evidencia serológica de la presencia de *Brucella spp.* en poblaciones de venado ni en la zona Noreste del país (Martínez et al., 1999; Cantú et al., 2008), así como tampoco en la zona de Baja California (Contreras et al., 2007).

2.6.2.3. Factores de riesgo

Se han realizado distintos estudios epidemiológicos para determinar factores asociados a la seroprevalencia de *Brucella spp.* en distintas poblaciones animales domésticos. En un estudio realizado en ganado bovino en distintas áreas de Zimbabue, se reportó que los animales con una edad entre los 2-4 años tienen 3.2 más probabilidades de presentar seropositividad que los >7años, así como también se asoció que las vacas con un previo historial de abortos presenten mayor probabilidad de seropositividad (Matope et al., 2011), en otros estudios también se ha reportado la edad e incluso el sexo como asociados a la seroprevalencia en ganado bovino (Mohammed et al., 2011) También se han reportado que el área geográfica de procedencia, el tamaño de los hatos y el contacto con animales silvestres tienen un efecto significativo en la seropositividad del ganado (Muma et al., 2007). En estudios realizados en hatos caprinos y bovinos se han observado que el que exista un contacto entre distintas especies domésticas o silvestres, el compartir fuentes de agua y medidas de manejo como el pastoreo y la falta de vacunación están relacionados significativamente a la seropositividad de *Brucella* en el ganado (Kabagambe et al., 2001; Omer et al., 2000; Mugaby, 2012).

2.6.3. Patogenia

Las especies de *Brucella* son bacterias intracelulares facultativas, propiedad que las mantiene protegidas de la acción de antibióticos y de factores bactericidas como el complemento y anticuerpos, lo que determina la naturaleza crónica de la infección. Su virulencia está relacionada con la capacidad que poseen para resistir el efecto bactericida de los mecanismos efectores dependientes de anticuerpos, así como su capacidad para adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células eucariotas, tanto fagocíticas como no fagocíticas. Cuando las bacterias ingresan al organismo pueden ser fagocitadas por células polimorfonucleares (PMN) o por macrófagos, multiplicándose dentro de las vacuolas fagocíticas, donde pueden desplegar mecanismos que bloquean o suprimen la respuesta bactericida de estas células. Si no son fagocitadas al momento de ingresar, estas viajan por vía linfática hasta los ganglios regionales desde ahí pueden invadir el torrente sanguíneo, donde serán fagocitadas por PMN y macrófagos circulantes y transportadas a los diversos órganos donde pueden sobrevivir y multiplicarse.

Los mecanismos de la bacteria para ingresar dentro de estas células aun no están totalmente claros, pero se presume que el LPS y las proteínas superficiales de membrana podrían estar involucrados en dichos mecanismos, mediante receptores tipo manosa o integrinas. Las células placentarias tienen gran cantidad de receptores de manosa y un factor de crecimiento conocido como eritritol, presente en tejidos placentarios animales, lo que explica la afección de *Brucella* por los mismos. Por otro lado se sabe que *B. abortus* evita su eliminación dentro de las PMN mediante la

producción de guanosina 5´monofosfato (GMP) y adenina que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, la desgranulación, la activación del sistema mielo-peroxidasa-haluro y la producción del TNF- α . La evolución de la infección varía en función de la especie afectada, en los mamíferos rumiantes y en los cerdos la manifestación clínica más evidente es la presentación del aborto (Castro et al., 2005; Mackintosh et al., 2002).

2.6.4. Diagnóstico

El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de la bacteria, frecuentemente de hemocultivos los que se deben mantener en incubación por un periodo de tiempo no menor a 30 días, ya que las bacterias del género *Brucella* son de crecimiento lento. Conforme progresa la enfermedad disminuye la probabilidad de positividad en los hemocultivos, por lo que el aislamiento se realiza a partir de ganglios linfáticos, hígado o bazo. Para el estudio de la presencia de antígeno de *Brucella* en los tejidos se pueden utilizar métodos de ELISA e inmunofluorescencia directa, así como PCR para la detección de material genético del patógeno en los tejidos.

Aunque el aislamiento bacteriológico es el método para establecer un diagnóstico definitivo, este presenta varias desventajas como el tiempo que consume su realización, los costos, lo laborioso del procedimiento y el que no se puede utilizar rutinariamente como método diagnóstico; además que la probabilidad de obtener exitosamente bacterias de *B. abortus* disminuye considerablemente cuando el material es contaminado o cuando solo unos organismos están presentes. Por dichas dificultades

los métodos de detección indirectos son el recurso de diagnóstico más utilizado. Se pueden utilizar distintas pruebas para la detección de anticuerpos contra *Brucella spp* como la prueba del anillo de leche, Rosa de Bengala, fijación de complemento, ELISA, Test de Coombs y la prueba de Rivanol (Castro et al., 2005; Bercovich, 1998).

3. Materiales y métodos

3.1. Estudio epidemiológico

El estudio epidemiológico realizado fue un estudio observacional descriptivo de tipo transversal.

3.2. Zona de estudio

El estudio se llevó a cabo en 3 microrregiones de la zona Noreste de México, 2 de ellas ubicados en los municipios de Villaldama y Linares, Nuevo León y otra localizada en Villagrán, Tamaulipas (Ver **Figura 5**). Dichas microrregiones presentan distintas condiciones ambientales y geográficas descritas en el **Cuadro 3**.

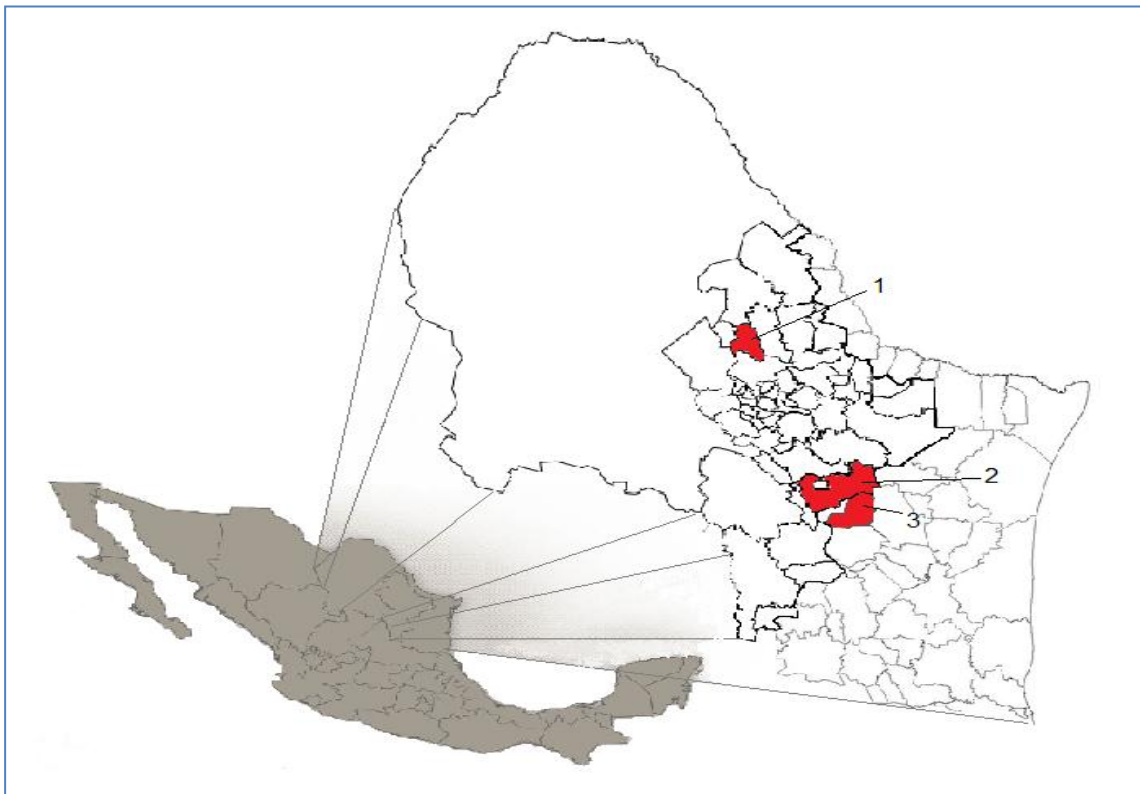


Figura 5. Ubicación geográfica de las microrregiones estudiadas. 1) Villaldama, Nuevo León; 2) Linares, Nuevo León; 3) Villagrán, Tamaulipas.

Cuadro 3. Características geográficas y ambientales de las microrregiones analizadas.

	Temperatura (°C)	Altitud (msnm)	Precipitación media anual (mm)	Clima	Vegetación
Villaldama	25	450	500	Semiárido. Temperaturas altas y lluvias	Matorral bajo espinoso
Linares	20	350	600	Semiseco extremadamente cálido	Matorral espinoso tamaulipeco
Villagrán	23.5	318	625	Subhumedo, semicálido y muy extremoso	Matorral alto espinoso

3.3. Muestreo

3.3.1. Metodología del muestreo

Se realizó un muestreo no probabilístico de conveniencia, siendo el objeto de estudio venados cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*) provenientes de UMA's dedicadas a la explotación intensiva o semi-intensiva de esta especie, ya sea para pie de cría y cacería o con fines de investigación. Las muestras se obtuvieron según la disponibilidad y facilidades durante los manejos técnicos y veterinarios de cada explotación. Los animales se capturaron por distintos métodos: contención química y contención física. En el caso de la contención química se realizó mediante la combinación de Zoletil (Tiletamina+Zolazepam) y Xilacina, dicha combinación se obtuvo mediante la mezcla de un vial que contiene polvo de tiletamina clorhidrato 250 mg y zolacepam clorhidrato 250 mg, al cual se le adicionó 5 ml de clorhidrato de xilacina al 10%. La solución combinada se administró en volúmenes de 0.5 ml a 1.5 ml

dependiendo del tamaño del animal, utilizando un rifle de dardos tranquilizantes impulsado por aire comprimido. Con respecto a la contención física, el manejo se realizó con la ayuda de una prensa para manejo de fauna silvestre, la cual facilita el manejo de los venados.

3.3.2. Número de muestras y procedencia

Se colectaron 204 muestras de suero de venado cola blanca de tres microrregiones del Noreste de México ubicadas en los municipios de Villaldama y Linares en el estado de Nuevo León, así como en el municipio de Villagrán en el estado de Tamaulipas (Ver **Cuadro 4**).

Cuadro 4. Número total de muestras obtenidas por microrregión y número de muestras analizadas para la detección de cada patógeno.

	<i>Número de muestras</i>	<i>Neospora caninum</i>	<i>VDVB</i>	<i>Brucella abortus</i>	<i>Leptospira spp</i>
Villaldama	94	65	48	94	17
Linares	59	59	59	59	17
Villagrán	51	51	51	51	17
	204	175	158	204	51

3.3.3. Colección y manejo de las muestras

Las muestras sanguíneas fueron tomadas por punción en la vena yugular y colectadas en tubos vacutainer® sin anticoagulante. Cada animal se inspeccionó físicamente para la búsqueda de alteraciones relativas a enfermedades y se evaluó la condición corporal del animal. Posteriormente, la sangre fue centrifugada a 2000 rpm

por 10 minutos para separar el suero, los cuales fueron colocados en tubos de propileno y se almacenaron a -20°C hasta su uso en los análisis serológicos.

3.4. Análisis serológico

3.4.1. *Neospora caninum*

3.4.1.1. Descripción general

Las muestras fueron analizadas mediante un ensayo comercial ELISA de inhibición competitiva (cELISA) “*Neospora caninum* Antibody Test Kit, cELISA” de VMRD, Inc., que utiliza anticuerpos monoclonales específicos contra el parásito. Los anticuerpos séricos contra *N. caninum* inhiben la unión de los anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa de rábano (Ac-m/HRP) específicos de *N. caninum* al antígeno adherido a las paredes de los pozos de las placas. La unión de los Ac-m/HRP es detectada mediante la adición del sustrato de la enzima y es cuantificada por el desarrollo subsecuente de coloración. Un color intenso (azul) indica que hubo un poco o ningún bloqueo de los Ac-m/HRP, por lo tanto revela la ausencia de anticuerpos contra *N. caninum* en la muestra. El desarrollo de un color menos intenso (celeste o azul pálido) es debido a que la muestra de suero posee anticuerpos que se unieron al antígeno adherido a la placa.

3.4.1.2. Componentes

- Placas cubiertas con el antígeno
- Control positivo

- Control negativo
- Conjugado (Ac-m/HRP) 100X
- Buffer diluyente del conjugado
- Solución concentrada de lavado 10X
- Solución sustrato
- Solución de paro de reacción

3.4.1.3. Material necesario

- Micropipeta ajustable sencilla y multicanal
- Puntillas para micropipeta
- Placas no cubiertas con antígeno para transferir la muestra
- Lector de ELISA
- Agua destilada
- Reservorios para pipetas multicanal
- Recipientes graduados (vasos y probetas)
- Botella de lavado, dispositivo de lavado multicanal manual o lavador automático de placas
- Reloj

3.4.1.4. Preparación

Lograr una temperatura apropiada: Las muestras de suero, los reactivos y las placas deben alcanzar la temperatura del cuarto (21-25°C) antes de comenzar la prueba.

Posición y control de muestras: Los controles positivos y negativos se “corren” por duplicado en cada prueba o placa. Se registra la posición de los controles y las muestras en un registro; el formato de la disposición de las muestras y controles se incluye en el anexo del kit.

Preparación de las placas: Remueva las placas de su envoltura. Coloque las líneas a utilizar en el bastidor y numere cada tira para mantener una orientación con el registro previamente llenado.

Preparación del conjugado: Preparar el conjugado Ac-m/HRP a la dilución de 1X mediante la dilución del conjugado 100X con 99 partes del buffer diluyente del conjugado.

Preparación de la solución de lavado: Preparar la solución de lavado 1X mediante la dilución de una parte de la solución concentrada 10X de lavado en 9 partes de agua destilada.

Preparación de dilución de los sueros: Los sueros se someten a la prueba SIN DILUIR.

3.4.1.5. Procedimiento

1.- Cargar los controles y las muestras de suero: Usando una micropipeta transferir 50 µl de los controles así como de las muestras en los pozos respectivos previamente seleccionados. Asegurarse que el suero cubra el fondo de la placa. Tener cuidado de no derramar líquidos o sueros en los pozos adyacentes. Incubar la placa 1 hora a temperatura de cuarto (21-25°C).

2.- Lavado de los pozos: Después de 1 hora de incubación se lavan los pozos de las placas 3 veces con la solución de lavado previamente diluida.

3.- Adición de conjugado: Se agregan 50 µl del conjugado diluido a cada pozo. Asegurarse de que se cubra el fondo del pozo. Incubar por 20 minutos a temperatura de cuarto.

4.- Lavado de los pozos: Después de los 20 minutos de incubación, repetir la etapa 2.

5.- Agregar la solución del sustrato: Se agregan 50 µl de la solución de sustrato a cada pozo. Se incuba por 20 minutos a temperatura de cuarto evitando la exposición a la luz solar.

6.- Adición de la solución de paro de reacción: Agregar 50 µl de la solución de paro y mezclar ligeramente dando suaves golpes al lado de la placa varias veces. No vaciar los pozos.

7.- Leer y registrar los resultados de la prueba: inmediatamente después de la adición de la solución de paro, la placa se deberá leer en el lector de placas en el cual debe ajustarse la longitud de onda de la lectura de densidad óptica a 620, 630 o 650 nm.

8.- Todos los reactivos sobrantes del kit deberán ser almacenados a una temperatura entre 2-7 °C.

3.4.1.6. Validación de la prueba

La media de los controles negativos debe producir una densidad óptica ≥ 0.30 y < 2.50 .

La media de los controles positivos debe producir $\geq 30\%$ de inhibición.

El cálculo del porcentaje de inhibición (I%):

$$I\% = 100 - [(O.D. \text{ de la muestra} \times 100) \div (\text{media del control negativo O.D.})]$$

3.4.1.7. Interpretación de los resultados

Si la muestra produce $\geq 30\%$ de inhibición, esta es positiva.

Si la muestra produce $< 30\%$ de inhibición, esta es negativa.

3.4.2. VDVB

3.4.2.1. Descripción general

Se utilizó el ensayo de seroneutralización viral (SN) para la detección de anticuerpos contra VDVB, la cual nos permite identificar y cuantificar la capacidad que poseen dichos anticuerpos de neutralizar o inhibir el efecto citopático del virus. Los anticuerpos neutralizantes son los responsables del efecto protector del suero y están dirigidos contra determinantes antigénicos específicos de la superficie del virus. La detección de anticuerpos neutralizantes contra VDVB es necesaria o adecuada cuando se desea detectar o establecer el estatus inmune o infeccioso de un hato, en conjunto con un resultado virológico positivo nos permite determinar la presencia individual de un animal PI, así como también para determinar un estado de infección agudo en un animal a través de la detección de seroconversión.

3.4.2.2. Material biológico y reactivos

- Línea celular MDBK (Madine Darby Bovine Kidney)
- Medio de cultivo DMEM F-12 con 10% Suero Equino (SE) y Antibiótico y Antimicótico (A/A)
- Medio de cultivo DMEM F-12
- Suero Equino (SE)
- Cepa Viral NADL como virus stock, mismo que debe ser diluido a una concentración de 100 TCID₅₀ en 50 µl de medio DMEM F-12 sin A/A ni SE.
- Muestra de suero problema
- Tripsina/EDTA
- Antibiótico y Antimicótico (A/A)

3.4.2.3. Material necesario

- Micropipetas de 10 µl, 200 µl y 1000 µl
- Placas de 96 pozos para microtitulación
- Micropipetas multicanales de 100 µl y 300 µl
- Pipetas serológicas estériles de 5, 10, 25 ml
- Puntillas para micropipeta estériles de 10, 200 y 1000 µl
- Dispensador multicanal estériles de 50 ml y 100 ml
- Depósitos de vidrio para soluciones estériles de 20 ml, 50 ml, 100 ml

3.4.2.4. Equipo e instrumentos

- Incubadora de CO₂ a 37°C y 5% de CO₂
- Auxiliar de pipetas
- Campana de flujo laminar
- Microscopio óptico invertido
- Refrigerador a temperatura de 5-9°C
- Baño María (37°C – 56°C)
- Congelador (-20°C)
- Agitador vórtex

3.4.2.5. Procedimiento

1.- Tratamiento de la muestra: Los sueros y controles se descongelan a temperatura ambiente y se mezclan mediante un agitador vórtex, posteriormente se inactiva el complemento en baño maría a 56°C por 30 minutos.

2.- Colocación del medio en las placas de prueba (Apéndice 1):

Placa 1: En los pozos correspondientes a las columnas A hasta H y las filas 1 al 4, depositar 150 µl de medio DMEM-F12 sin A/A ni SE, usando una micropipeta multicanal. En el resto de los pozos depositar 100 µl de medio DMEM F-12 sin A/A ni SE en cada pozo.

Placa 2 a la 4 (Solo si son necesarios) Colocar 100 µl de medio DMEM F-12 sin A/A ni SE, en cada uno de los pozos.

3.- Colocación y dilución del control positivo (CP) y control negativo (CN) en la placa de prueba 1 (Apéndice 1):

Placa 1: Colocar 50 µl de control positivo (CP) en los pozos A5, A6, B5 y B6, y 50 µl de control negativo (CN) en los pozos A7, A8, B7 y B8, mezclar con puntillas estériles y nuevas el contenido de los pozos B5 al B8 como mínimo 8 veces, tomar 50 µl y depositarlos en los pozos de la columna siguiente (C5 al C8), así sucesivamente hasta los pozos de la columna H. Desechar los 50 µl de los pozos H5 al H8. Por último registrar en el formato F-377. Estos controles sirven solo para una corrida donde se pueden analizar hasta 20 muestras.

4.- Colocación y dilución de las muestras de suero problema (SP) (Apéndice 1):

Placa 1: En esta placa se puede correr solo 2 muestras de suero problema por duplicado, depositando 50 µl de suero problema 1 (SP1) en los pozos A9, A10, B9 y B10, con puntillas nuevas y estériles, si fuera necesario por la cantidad de muestras, depositar 50 µl del suero problema 2 (SP2) en los pozos A11, A12, B11 y B12. Mezclar por lo menos 8 veces con puntillas nuevas y estériles el contenido de los pozos B9 al B12 y tomar 50 µl y depositarlos en los pozos de la columna siguiente (C9 al C12). Repetir el procedimiento de mezclado hasta los pozos de la última columna (H9 al H12). Desechar 50 µl de los pozos H9 al H12. Por último registrar el número de caso y su identificación en el formato F-377.

Placas 2 a la 4: Estas placas se utilizan solo si la cantidad de muestras de suero problema es superior a 2 e inferior a 20, depositando 50 µl de cada muestra de suero

problema por duplicado en los pozos correspondientes desde A1 al A12 y B1 al B12 identificándose como suero problema 3 al 20 (SP3 al SP20). Analizar como máximo 6 muestras de suero problema por placa. Con puntillas nuevas y estériles, mezclar el contenido de los pozos B1 al B12 por lo menos 8 veces y tomar 50 µl de la mezcla y depositar en los pozos de la siguiente columna (C1 al C12). Repetir el procedimiento de mezclado hasta los pozos de la última columna (H1 al H12). Desechar 50 µl de los pozos H1 al H12, por último registrar el número de caso y su identificación en el formato F-377.

5.- Colocación del virus NADL diluido en las placas de prueba 1 a la 4 (Apéndice 1).

Placa 1: Se depositan con una micropipeta multicanal, puntillas nuevas y estériles 50 µl de virus NADL diluido a 100 TCID₅₀/50 µl en cada pozo de las columnas B hasta H y las filas 5 a la 12. Para evitar contaminación de los pozos, no tocar el borde del pozo con la puntilla. De los pozos 5 al 12 de la columna A no se deposita el virus diluido ya que estos pozos servirán como control de toxicidad de la muestra de suero problema.

Placas 2 a la 4: Depositar 50 µl de virus NADL diluido a 100TCID₅₀/50 µl en los pozos correspondientes desde la columna B hasta H y las filas 1 a 12. Para evitar contaminación de los pozos, no tocar el borde del pozo con la puntilla. Los pozos 1 al 12 de la columna A no se depositan el virus diluido ya que estos pozos servirán como control de toxicidad de la muestra de suero problema.

6.- Titulación de la dilución viral de uso (DVU) (Apéndice 1): Del virus de NADL diluido a 100 TCID₅₀/50 µl, depositar 50 µl en los pozos A1 al A4 de la placa de prueba 1.

Mezclar como mínimo 8 veces, usando una micropipeta con puntillas nuevas y estériles, tomar 50µl de la mezcla y depositar en los pozos de la siguiente columna (B1 al B4). Repetir el procedimiento de mezclado hasta los pozos de la columna (G1 a G4). Desechar 50µl de los pozos G1 a G4. Los pozos H1 a H4 no llevarán virus ya que estos pozos servirán como control celular de prueba (CC).

7.- Incubación de las placas de prueba sin células indicadoras: Las placas de prueba (placas 1 a la 4) se incuban a 37°C +/- 0.5°C y una atmósfera de 5% de CO₂, por un tiempo de 90 minutos, antes de agregar las células indicadoras.

8.- Incorporación de las células indicadoras e incubación de las placas de prueba: Una vez terminado el tiempo de incubación de las placas de prueba sin células, se añade 50 µl de una suspensión de células a razón de 2.5x10⁵/50 µl células por pozo (Ver instructivo de trabajo I-D- 019). Lo anterior usando una micropipeta multicanal, puntillas nuevas y estériles, cuidando que la puntilla de la micropipeta no deberá tocar el borde del pozo para evitar contaminación de las placas de prueba. Posteriormente las placas de prueba se incubarán a 37°C +/- 0.5°C, con una atmósfera de 5% de CO₂ por un tiempo de 3-5 días.

9.- Revisión de las placas de prueba: La revisión de las placas es diaria usando un microscopio invertido. Se revisa la monocapa celular de todos los pozos completamente, verificando el crecimiento uniforme de las células, principalmente en los pozos que contienen el control celular de prueba (G1 a G4). Además se verifica la presencia o no de efecto citopático (ECP) específico de el virus NADL sobre la

monocapa de las células de todos los pozos y se documenta en el formato F-377 como (+) si existe ECP y (-) si no existe ECP.

El efecto citotóxico de las muestras de suero problema se marca con una línea diagonal en la placa de prueba, así como en el formato de trabajo (F-377). La contaminación bacteriana de los pozos se indica con un cambio en la coloración del medio de las placas de prueba y los pozos que presenten esta condición no serán tomados en cuenta en el resultado y se marca con una X sobre la placa de prueba y en el formato de trabajo.

3.4.2.6. Cálculo de los resultados y validación de la prueba

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en las muestras de suero problema (SP), dilución viral de uso (DVU) y controles positivos (CP) así como negativos (CN) se calcula mediante la fórmula utilizada por Spaerman-Kärber.

$$\text{Título} = D^R$$

Mediante la fórmula $\text{Título} = -\log_{10}(D^r)$ [$\text{Log}_{10} \text{DN}_{50}$] esto es [$\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50}$]

Donde:

$r =$ a valores de reacción, que es igual a $\frac{(\text{pozos de las placas de prueba sin ECP})(\text{SP, CP, CN})}{(\text{pozos de DVU sin ECP})}$ / el número de replicados en un grado de dilución

$R =$ Suma del valor de $r + 0.5$

$D =$ Factor de dilución

Los resultados de la seroneutralización viral para DVB se dan como el logaritmo decimal de la dosis neutralizante al 50% ($\log_{10}DN_{50}$)($-\log_{10}$) ó también la dilución más alta de la muestra de suero problema en la cual no se observa ECP en el 50% de los pozos de la placa de prueba.

3.4.3. *Leptospira spp.*

3.4.3.1. Descripción general

La prueba utilizada para el diagnóstico de *Leptospira spp* fue microaglutinación en placa, la cual es la técnica de referencia dentro de los ensayos serológicos para el diagnóstico de las distintas serovariedades de este patógeno. El principio del ensayo se basa en la observación con microscopio de campo oscuro la reacción de aglutinación resultante de la mezcla de la dilución inicial del cultivo de bacterias y la dilución del suero problema; una reacción se considera positiva cuando se produce una microaglutinación del 50% de las bacterias. Las serovariedades que se analizaron fueron: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. bratislava*, *L. hardjo*, *L. tarassovi*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa* y *L. pyrogenes*.

3.4.3.2. Material necesario

- Micropipeta ajustable sencilla
- Puntillas para micropipeta
- Placas de ELISA no cubiertas
- Microscopio de campo oscuro
- PBS (10X)

- Reservorios para pipetas multicanal
- Recipientes graduados (vasos y probetas)
- Reloj
- Medio de cultivo con 0.2% TPB

3.4.3.3. Preparación

Obtención de temperatura apropiada: Se debe trabajar a una temperatura promedio de 30°C.

Los antígenos: Las cepas de las bacterias seleccionadas deben haber crecido en un medio de cultivo con 0.2% de TBP o Tween 80 BSA a 30°C, además el cultivo no debe pasar entre 4-8 días desde su preparación.

PBS (1X): Se diluye una parte de la solución concentrada de PBS 10X en 9 partes de agua destilada.

Preparación de dilución de los sueros: Los sueros se diluyen a 1:50 con PBS 1X.

3.4.3.4. Procedimiento

1.- Se colocan en los pocillos de la placa 6 µl del suero previamente diluido a 1:50 con 6 µl del cultivo de la serovariedad a probar.

2.- se incuba la placa a 30°C por un intervalo de 2 horas.

3.- Después de la incubación se procede a la observación de microaglutinación con el microscopio de campo oscuro con una amplificación de 200X.

4.-El porcentaje de las bacterias libres se compara con el control en donde el cultivo se diluye 1:2 con PBS al 1X.

3.4.3.5. Interpretación de resultados

Se estima el porcentaje de aglutinación y cuando se presente un 50% de aglutinación posteriormente se procede a la titulación del suero problema hasta que no suceda o disminuya significativamente la aglutinación.

3.4.4. *Brucella abortus*

3.4.4.1. Descripción general

El diagnóstico se realizó con muestras de suero sanguíneo mediante el uso de la prueba de Rosa de Bengala la cual se utiliza en el diagnóstico de la brucelosis como prueba tamiz por ser sencilla, rápida y sensible, aunque cualquier resultado positivo debe ser confirmado con otras pruebas bacteriológicas y serológicas. Esta prueba detecta anticuerpos aglutinantes empleando células de *Brucella* inactivadas, teñidas con el colorante Rosa de Bengala y ajustadas a un pH ácido. El pH ácido de la suspensión impide la aglutinación inespecífica de las bacterias, contribuyendo así a la especificidad de la prueba. En la reacción intervienen anticuerpos aglutinantes IgG, IgM e IgA. El antígeno y el método empleado está acorde a la NOM-041-ZOO-1995 de la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales (SAGARPA).

3.4.4.2. Material necesario

- Antígeno elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus* teñido con el colorante Rosa de Bengala, pH de 3.65 (± 0.05)
- Control positivo
- Control negativo
- Muestras de suero problema

3.4.4.3. Procedimiento

- 1.- Colocar 30 μ l del suero a probar en una placa de aglutinación.
- 2.- Colocar 30 μ l del antígeno teñido con el colorante Rosa de Bengala
- 3.- Mezclar el suero con el antígeno con una varilla mezcladora
- 4.- Agitar la placa manualmente.

3.4.4.4. Interpretación de resultados

Una aglutinación positiva indica la presencia de anticuerpos contra *B. abortus*.

3.5. Análisis estadístico

La seroprevalencia de cada uno de los cuatro patógenos se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Número de animales positivos}}{\text{Número de animales muestreados}} \times 100$$

También se determinó el grado de asociación entre los índices de seropositividad y de seroprevalencia con la microrregión de procedencia del venado usando la prueba de Chi-cuadrada. Los análisis estadísticos se ejecutaron con la ayuda del paquete computacional “SAS v6.12” (SAS, 1999).

4. Resultados

4.1. Seroprevalencia de *N. caninum*

De las 204 muestras recolectadas, 175 muestras se analizaron para la detección de anticuerpos contra *N. caninum* de las cuales 47 resultaron positivas a la prueba representando un 26.9% de seroprevalencia general en el Noreste de México. La seroprevalencia por microrregión fue de 18.5% (12/65) en Villaldama, 30.5% (18/59) en Linares y 33.3% (17/51) en Villagrán.

4.2. Seroprevalencia de *Leptospira spp.*

Se analizaron 51 muestras para la detección de anticuerpos contra *Leptospira spp* (9 serovariedades) presentando una seroprevalencia general de 64.7% (33/51). Las prevalencias observadas en las microrregiones fueron 35.3% (6/17) en Villaldama, 88.2% (15/17) en Linares y 70.6% (12/17) en Villagrán.

En los sueros analizados se observó la presencia de anticuerpos contra 8 de las 9 serovariedades (**Cuadro 5**) que fueron probadas, con distintos grados de titulación (**Cuadro 6**). La serovariedad *L. bratislava* fue la predominante presentándose en 19 de los 51 sueros, lo que representa una seroprevalencia general del 37.3%, seguido por la serovariedad *L. pomona* observándose una prevalencia de anticuerpos de 25.5% (13/51), después le siguen las serovariedades *L. tarassovi* con 13.7% (7/51), *L. pyrogenes* con 9.8% (5/51), *L. canicola* con 5.9% (3/51), *L. hardjo* con 3.9% (2/51), *L. grippotyphosa* con 2.0% y *L. wolffi* con 2.0%; no se encontró evidencia serológica de la serovariedad *L. icterohaemorrhagiae*.

Por microrregión, en Villaldama se observaron 5 de las 9 serovariedades siendo la predominante *L. bratislava* con una seroprevalencia de 23.5% (4/17), seguido por *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. canicola* y *L. tarassovi*, todas con una seroprevalencia de 5.9% (1/17) cada una. Además, dos de las muestras resultaron seropositivas a 2 distintas serovariedades (*L. pomona-L. tarassovi* y *L. canicola-L. bratislava*). Fue la microrregión con menor número de animales seropositivos. En Linares, solo se presentaron 4 de las 9 serovariedades estudiadas, de las cuales predominó *L. bratislava* con 58.8% (10/17), siendo esta la mayor prevalencia de esta serovariedad de las tres microrregiones; *L. pomona* presentó una seroprevalencia de 29.4% (5/17); solo se encontró evidencia de anticuerpos contra *L. grippotyphosa* en esta microrregión cuya prevalencia fue de 5.9% (1/17); y por último, se observó una seroprevalencia de *L. hardjo* de 5.9% (1/17). Además, dos de las muestras resultaron seropositivas a dos distintas serovariedades (*L. pomona-L. bratislava*). En Villagrán se observó una mayor diversidad de serovariedades encontrándose 6 de las 9 serovariedades analizadas, así como también se observó un mayor título de anticuerpos llegando hasta 1:400. La serovariedad predominante fue *L. pomona* con una seroprevalencia de 41.2% (7/17), siendo la más alta entre las microrregiones analizadas; *L. tarassovi* presentó una prevalencia de 35.3% (6/17) seguido por *L. bratislava* con 29.4% (5/17) y *L. pyrogenes* 29.4% (5/17), la cual solo se observó en esta microrregión; *L. canicola* presentó una prevalencia de 11.8% (2/17) y *L. wolffi* de 5.9% (1/17), esta última solo encontrándose en esta microrregión.

Cuadro 5. Seroprevalencia de *Leptospira spp.* en poblaciones de venado cola blanca en tres microrregiones del Noreste de México.

	Villaldama	Linares	Villagrán	Total
<i>L. hardjo</i>	5.9%	5.9%	0.0%	3.9%
<i>L. pyrogenes</i>	0.0%	0.0%	29.4%	9.8%
<i>L. grippotyphosa</i>	0.0%	5.9%	0.0%	2.0%
<i>L. canicola</i>	5.9%	0.0%	11.8%	5.9%
<i>L. pomona</i>	5.9%	29.4%	41.2%	25.5%
<i>L. wolffi</i>	0.0%	0.0%	5.9%	2.0%
<i>L. bratislava</i>	23.5%	58.8%	29.4%	37.3%
<i>L. tarassovi</i>	5.9%	0.0%	35.3%	13.7%

No se incluyó la serovariedad *Icterohemorrhagiae* debido a que no se encontró evidencia de actividad serológica en las poblaciones analizadas

Cuadro 6. Seropositividad contra distintas serovariedades de *Leptospira spp.* en poblaciones de venado cola blanca en tres microrregiones del Noreste de México.

	Títulos			Positivos
	1:100	1:200	1:400	
Villaldama				
<i>L. hardjo</i>	1	-	-	1
<i>L. grippotyphosa</i>	1	-	-	1
<i>L. pomona</i>	1	-	-	1
<i>L. bratislava</i>	4	-	-	4
<i>L. tarassovi</i>	1	-	-	1
Linares				
<i>L. hardjo</i>	1	-	-	1
<i>L. canicola</i>	1	-	-	1
<i>L. pomona</i>	4	1	-	5
<i>L. bratislava</i>	10	-	-	10
Villagrán				
<i>L. pyrogenes</i>	2	-	3	5
<i>L. canicola</i>	1	1	-	2
<i>L. pomona</i>	2	3	2	7
<i>L. wolffi</i>	-	1	-	1
<i>L. bratislava</i>	3	2	1	6
<i>L. tarassovi</i>	3	2	-	5
Total	35	10	6	51

4.3. Seroprevalencia de VDVB

Se analizaron 158 sueros de venado cola blanca para la detección de anticuerpos contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina mediante la prueba de seroneutralización, no encontrándose evidencia de la presencia de anticuerpos contra este virus.

4.4. Seroprevalencia de *Brucella abortus*

Para la detección serológica de *Brucella abortus*, se analizaron un total de 204 muestras de suero de venado cola blanca a las cuales se les realizó la prueba de Rosa de Bengala. Ninguna de las muestras serológicas resultó positiva a la prueba.

Cuadro 7. Seroprevalencia de *Brucella abortus*, VDVB, *Neospora caninum* y *Leptospira spp.* en poblaciones de venado cola blanca en el Noreste de México

Patógeno	Muestras analizadas	Microrregión			Total*
		Villaldama*	Linares*	Villagrán*	
<i>Brucella abortus</i>	204	0.0	0.0	0.0	0.0
VDVB	158	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Neospora caninum</i>	175	18.5	30.5	33.3	26.9
<i>Leptospira spp</i>	51	35.3	88.2	70.6	64.7
<i>L. bratislava</i>	-	23.5	58.8	29.4	37.3
<i>L. pomona</i>	-	5.9	29.4	41.2	25.5
<i>L. tarassovi</i>	-	5.9	0.0	35.3	13.7
<i>L. pyrogenes</i>	-	0.0	0.0	29.4	9.8
<i>L. canicola</i>	-	5.9	0.0	11.8	5.9
<i>L. hardjo</i>	-	5.9	5.9	0.0	3.9
<i>L. grippotyphosa</i>	-	0.0	5.9	0.0	2.0
<i>L. wolffi</i>	-	0.0	0.0	5.9	2.0
<i>L. icterohemorrhagiae</i>	-	0.0	0.0	0.0	0.0

*Las columnas están expresadas en porcentaje (%).

4.5. Asociación entre la prevalencia de anticuerpos contra *N. caninum* y la microrregión analizada

Después de la determinación de la seroprevalencia contra *N. caninum*, se realizó una tabla de contingencia para determinar la asociación entre el índice de seropositividad y seroprevalencia con la microrregión de procedencia de la muestra, analizándose por la prueba de Chi-cuadrada. En el **Cuadro 8** se muestran los valores esperados obtenidos en el cuadro de contingencia y los valores observados en el estudio, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre ambos factores.

Cuadro 8. Análisis de contingencia de Chi-cuadrada para estimar la asociación entre la seroprevalencia de *Neospora caninum* en Venados Cola Blanca Texano con la microrregión de procedencia.

Microrregión	Valores esperados*	Valores observados	Seroprevalencia
Villaldama, N.L	17.5 / 47.5	12 / 53	18.5%
Linares, N.L	15.8 / 43.2	18 / 41	30.5%
Villagrán, Tamps.	13.7 / 37.3	17 / 34	33.3%

* Valores esperados obtenidos con una tabla de contingencia donde se presentó un valor crítico de $X^2_{.95}=5.99$ el valor de X^2 es de $3.82 < 5.99$, por lo que la seroprevalencia y seropositividad son independientes a la microrregión de procedencia con un nivel de significancia de 0.05.

4.6. Asociación entre la prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira spp.* y la microrregión analizada

Al encontrar evidencia de anticuerpos contra las distintas serovariedades de *Leptospira spp.* previamente mencionadas, se procedió con la realización de un análisis de contingencia de Chi-cuadrada para estimar la asociación entre el índice de seropositividad y seroprevalencia con la microrregión de procedencia de la muestra, donde se encontró una asociación estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre la microrregión analizada y la prevalencia de leptospirosis (**Cuadro 9**).

Al encontrarse que la prevalencia de leptospirosis y el lugar de procedencia de la muestra están estadísticamente relacionados, se analizó la asociación entre la seroprevalencia del patógeno con las características geográficas y ambientales (altura, precipitación media anual y temperatura media anual) propias de cada microrregión. En los resultados de dicho análisis se observó que individuos expuestos a una precipitación media anual mayor de 600 mm y una altitud mayor a 400 msnm tienen 7 veces más probabilidades de estar expuestos a alguna de las serovariedades de *Leptospira spp.*; así como también en ambientes más frescos debajo de los 20 °C se tiene entre 1.47 y 30.19 más probabilidades de estar expuestos al patógeno. En el **Cuadro 10** se muestran los valores de OR para los factores de riesgo ambientales.

Cuadro 9. Análisis de contingencia de Chi-cuadrada para estimar la asociación entre la seroprevalencia de *Leptospira spp.* en venados cola blanca texano con la microrregión de procedencia.

Microrregión	Valores esperados*	Valores observados	Seroprevalencia
Villaldama, N.L	11 / 6	6 / 11	35.3%
Linares, N.L	11 / 6	15 / 2	88.2%
Villagrán, Tamps.	11 / 6	12 / 5	70.6%

* Valores esperados obtenidos en una tabla de contingencia donde se presentó un valor crítico de $X^2_{.95}=5.99$ el valor de X^2 es de $10.81 > 5.99$, por lo que la seropositividad y la microrregión están significativamente asociadas con un nivel de significancia de 0.05.

Cuadro 10. Factores de riesgo ambientales asociados a anticuerpos contra *Leptospira spp.* en venado cola blanca en el Noreste de México.

Altitud y Precipitación media anual	Total	Positivos	Prevalencias	OR	IC _{95%}	P
≥400 msnm/ ≥600 mm	34	27	79.4%	7.07	2.03-24.57	0.0019
<400 msnm/ <600 mm	17	6	35.3%	1		
Temperatura						
>20°C	34	18	52.9%	1		0.0129
≤20°C	17	15	88.2%	6.67	1.47-30.19	

IC: Intervalo de confianza.

5. Discusión

5.1. *Neospora caninum*

Los datos del presente estudio muestran índices de seropositividad de moderados a altos (18-33%) contra *Neospora caninum* en tres microrregiones de la zona noreste de México; los resultados observados muestran una mayor presencia de anticuerpos que lo reportado por Olamendi-Portugal et al (2012) en un estudio realizado en la región fronteriza de la zona Noreste de México donde se encontró una prevalencia de 8.4% (31/368) en poblaciones de venado cola blanca en UMA's extensivas; así como también en lo reportado por Bautista (2011), donde se observó una seroprevalencia de este parásito de 11% (4/37) en cérvidos exóticos (*Axis* y *Gamo* europeo) en una UMA de manejo extensivo ubicada en Soto la Marina, Tamaulipas; esta diferencia en la prevalencia del parásito *N. caninum* puede estar obedeciendo a factores externos al microambiente ya que, aparentemente, no existe una asociación entre la seroprevalencia con la microrregión analizada, según con lo encontrado en el presente trabajo. Los factores externos al microambiente que pueden afectar la prevalencia y distribución de *N. caninum* dentro de las poblaciones de cérvidos podrían estar relacionados con el manejo de las explotaciones animales y/o debido a la presencia de hospedadores en la región, así como a factores desconocidos. En un estudio realizado en hatos con sistema vaca-cría del estado de Nuevo León (Domínguez-Díaz, 2009) se encontraron distintos factores de riesgo asociados al manejo de la explotación, como el manejo de las praderas, el tamaño del hato, la disposición de las placentas y desechos de abortos. Si comparamos los estudios

realizados en la región por el tipo de explotación (intensivo o semi-intensivo vs extensivo) de poblaciones de rumiantes domésticos y silvestres, cabe destacar que la diferencia de seroprevalencias del parásito entre las poblaciones de rumiantes son muy distintas, sin embargo se observa una tendencia a la alta en la prevalencia en ambas especies que puede deberse a distintos factores, uno de los más evidente es la densidad poblacional dentro de las explotaciones, lo que podría estar alterando la distribución y prevalencia de *Neospora caninum* entre las poblaciones de venado cola blanca. También la evidencia serológica de la presencia del parásito en ganado bovino en estudios realizados en la región (Domínguez-Díaz, 2009), donde se reportó una prevalencia de 3% y 8.5% en los municipios de Villaldama y Linares, respectivamente; lo que indica que es muy probable que el parásito circule dentro y entre distintas poblaciones de rumiantes silvestres y domésticos.

5.2. *Leptospira spp.*

Debido a los diversos factores que influyen en la epidemiología de este patógeno, como lo son condiciones ambientales como la temperatura y la humedad del hábitat, así como factores de manejo como la densidad de animales dentro de una región y también la interacción entre distintas especies animales domésticas o silvestres, estos factores pueden favorecer en la transmisión y prevalencia de la bacteria no solo en animales domésticos de interés productivo, sino también en especies silvestres como el venado cola blanca la cual puede influir de la misma manera en la prevalencia de la enfermedad en animales domésticos. En el presente trabajo se observó que la prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en las

poblaciones estudiadas de venado cola blanca fue alta de 64.7% (35.3%-88.2%) siendo en general las serovariedades predominantes *L. bratislava* y *L. pomona*, lo que coincide con lo encontrado en un estudio realizado en Minnesota, donde encontraron 43% de animales seropositivos a las mismas serovariedades (Goyal et al., 1992), pero contrastante a lo reportado por Cantú et al., (2008) en un estudio realizado en el Noreste de México y a lo publicado por Wolf et al. (2008) de una región del medio oeste de los Estados Unidos de América. En ambos estudios, se observaron seroprevalencias relativamente bajas de 5.6% y 19% respectivamente, coincidiendo en éste último las serovariedades observadas *L. pomona* y *L. bratislava*, así como también la serovariedad *L. grippotyphosa*; a diferencia de lo observado por Cantú et al. (2008) el cual reportó evidencia serológica solo de la serovariedad *L. hardjo*. En un estudio realizado en cérvidos exóticos en una UMA localizada en Soto la Marina, Tamaulipas, se observó una seroprevalencia del 13.6% predominando las serovariedades *L. bratislava* y *L. muenchen* (Bautista, 2011); esta diferencia en las prevalencias de leptospirosis en los distintos estudios mencionados puede deberse al tipo y manejo de la explotación y/o a variables ambientales de las regiones estudiadas, siendo en condiciones de confinamiento o alta densidad poblacional, así como condiciones ambientales en las que se mantenga una humedad adecuada para la supervivencia de *Leptospira* en el ambiente, probables factores de alta importancia para el aumento en la prevalencia de la bacteria. En el presente estudio se identificaron anticuerpos contra 8 de 9 serovariedades analizadas, en Linares se encontraron 4 serovariedades (*L. hardjo*, *L. canicola*, *L. pomona* y *L. bratislava*); en Villaldama 5 serovariedades (*L. hardjo*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. bratislava* y *L. tarassovi*); y en Villagrán 6 de las 9

serovariedades (*L. pyrogenes*, *L. canicola*, *L. pomona*, *L. bratislava*, *L. wolffi* y *L. tarassovi*) esta última siendo la que mayor número de serovariedades presentó lo que puede deberse a la humedad presente en el ambiente de esta microrregión debido las altas precipitaciones. Las únicas serovariedades presentes en las tres microrregiones son *L. bratislava* y *L. pomona*, esto puede ser debido a las condiciones ambientales y geográficas predisponentes para su desarrollo están presentes en dichas microrregiones, así como pueden presentar una mayor adaptabilidad a estas o puede ser que los cérvidos sean más predisponentes a dichas serovariedades. Otro probable factor que puede influir en la prevalencia de algunas serovariedades es la interacción con especies reservorias de las mismas, de las serovariedades predominantes en este estudio *L. bratislava* se asocia a distintos reservorios, siendo el cerdo el principal entre las especies domésticas y en menor medida a bovinos; en el caso de *L. pomona* diversas especies domésticas pueden ser potenciales reservorios como bovinos, ovejas, cabras, caballos y cerdos; por lo tanto la probable interacción directa o indirecta del venado cola blanca con bovinos y cerdos cercanos a las explotaciones muestreadas así como con otras especies domésticas y silvestres, puede estar influyendo en la prevalencia de dichas serovariedades.

También se identificaron factores de riesgo ambientales y geográficos asociados ($P < 0.05$) a la prevalencia del patógeno como lo son temperatura, altura y precipitación; estos factores pueden no solo afectar la circulación del patógeno, sino también a la presencia de un mayor número de serovariedades como se observó en el presente estudio. La identificación de factores ambientales, como lo son la precipitación y la

temperatura asociados a la seroprevalencia del patógeno, así como otros factores de riesgo ajenos al microambiente, en poblaciones semi-intensivas de venado cola blanca nos puede ayudar no solo a la comprensión y entendimiento del patógeno sino también al control y prevención del mismo.

5.3. VDVB

Interesantemente y a diferencia de lo reportado en estudios serológicos anteriores que se han realizado en cérvidos en el Noreste de México, en los cuales se han encontrado prevalencias de 24.3-63.5% (Bautista-Piña, 2011; Cantú et al., 2008), en el presente trabajo no se encontró evidencia serológica contra el Pestivirus Diarrea Viral Bovina (VDVB-1, cepa NADL), por lo que es altamente probable, y dada la sensibilidad y especificidad de la prueba de seroneutralización, que las poblaciones estudiadas no han sido expuestas al Virus de la Diarrea Viral tipo 1 ó Pestivirus estrechamente relacionados a nivel antigénico. La diferencia entre lo encontrado en el presente estudio y lo reportado previamente en la región, tal vez puede deberse al método serológico empleado ya que en el presente trabajo se utilizó la técnica de seroneutralización viral considerada como la “prueba de oro” para la detección de anticuerpos contra VDVB ,y no una prueba ELISA como en los trabajos previamente realizados, porque además de su alta sensibilidad presenta un gran especificidad siendo utilizada en trabajos previos para la detección del VDVB en cérvidos del oeste de Estados Unidos (Aguirre et al., 1995) detectando una seroprevalencia de 55-59% en dos especies de cérvidos nativos de dicha región; otro factor que puede haber influenciado en el que no se encontrara evidencia de anticuerpos contra este patógeno

puede ser el tipo de muestreo, debido a que fue un muestreo de conveniencia por lo cual se tuvo la limitante del número y cantidad de muestras obtenidas, donde puede ser que el número de individuos expuestos al patógeno sea tan pequeño que el tamaño de la muestra no fue suficiente para reflejar el verdadero estado de la población estudiada, como lo reportado en un estudio realizado en Indiana, Estados Unidos donde se encontró una prevalencia de 0.3% (2/745) en poblaciones de venado cola blanca (Pogranichniy et al., 2008) donde se necesitó un gran número de muestras para su detección serológica ; también otro factor que pudo haber influenciado en que las poblaciones de venado estudiadas hayan presentado una seroprevalencia contra el VDVB mucho menor a las reportadas en la región anteriormente, pudo deberse a la falta de interacción con especies de rumiantes domésticos, especialmente bovinos, debido a que las poblaciones estudiadas en el presente estudio están en condición de cautiverio, dicha interacción ha sido identificado como factor de riesgo en la seroprevalencia del virus en venado cola blanca (Cantú et al., 2008); así como el haber muestreado en una zona diferente con condiciones ambientales y de una mayor densidad poblacional a la previamente estudiadas.

5.4. *Brucella abortus*

Los resultados del presente estudio muestran la ausencia de anticuerpos contra el patógeno en poblaciones de venado cola blanca, esto concuerda con estudios anteriormente realizados en México y Estados Unidos en venados (Aguirre et al., 1995; Wolf et al., 2008; Cantú et al., 2008; Martínez et al., 1999; Contreras et al., 2007). A pesar de la falta de evidencia de anticuerpos contra brucelosis y debido al impacto

productivo y zoonosológico de la enfermedad, es importante su monitoreo en las diversas especies que pudieran ser afectadas.

6. Conclusiones

Las poblaciones de venado cola blanca texano manejados intensiva o semi-intensivamente y localizados en tres distintas microrregiones del Noreste de México muestran anticuerpos contra *Neospora caninum* y distintas variedades de *Leptospira spp.*

Aparentemente existe una ausencia de seropositividad contra *Brucella abortus* y el Virus de la Diarrea Viral Bovina (Pestivirus, cepa NADL) en las poblaciones de venado cola blanca texano de las tres microrregiones selectas del Noreste de México.

Las serovariedades de *Leptospira spp.* de mayor predominancia fueron *L. bratislava* y *L. Pomona*, no obstante también ocurre seropositividad en venado cola blanca texano contra otras serovariedades (*L. tarassovi*, *L. pyrogenes*, *L. canicola*, *L. hardjo*, *L. grippotyphosa*, *L. wolffi*) de múltiples reservorios.

Se determinó una clara relación entre la presencia de anticuerpos anti-leptospira spp. venado cola blanca texano con la microrregión de procedencia, en la cual influye fuertemente la precipitación media anual y la altura snm.

Se encontró que *Neospora caninum* y distintas variedades de *Leptospira spp.* co-circulan en venado cola blanca texano localizados en distintas microrregiones del noreste de México.

7. Literatura citada

- Adler B., Peña M.A. 2004. *Leptospira*. Gyles C.L., Prescott J.F., Sanger J.G., Theon C.O. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3ra Ed. Black well Publishing: Ames Iowa, USA. **28**: 385-396.
- Aguirre, A.A., D.E. Hansen, E.E. Starkey, and R. G. McLean. 1995. Serologic survey of wild cervid for potential disease agents in selected national parks in the United States. *Preventive Veterinary Medicine* **21**: 313–322.
- Aguirre, A.A., D.E. Hansen, E.E. Starkey, and R. G. McLean. 1995. Serologic survey of wild cervid for potential disease agents in selected national parks in the United States. *Preventive Veterinary Medicine* **21**: 313–322.
- Álvarez-Romero, J. y Medellín-Legorreta, R. A. 2005. *Odocoileus virginianus*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Base de datos SNIB-CONABIO; Proyecto U020, 1-6.
- Anderson T., Dejardin A., Howe D. K., Dubey J. P., and Michalski M. L. 2007. *Neospora caninum* antibodies detected in midwestern white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) by Western blot and ELISA. *Vet. Parasitol.* **145**:152–155.
- Anderson, M. L., Andrianarivo A. G., and Conrad P. A. 2000. Neosporosis in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **60–61**:417–431.
- Barling K. S., McNeill J. W., Paschal J. C., McCollum III F. T., Craig T. M., Adams L. G., and Thompson J. A. 2001. Ranch-management factors associated with antibody

- seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. *Prev. Vet. Med.* **52**:53–61.
- Barling K. S., Sherman M., Peterson M. J., Thompson J. A., McNeill J. W., Craig T. M., and Adams L. G. 2000. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **217**:1361–1365.
- Baszler, T.V., Adams S., Vander S.J., Mathison B.A., Kostovic M. 2001. Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Journal of Clinical Microbiology.* **39**(11):3851-3857
- Bautista-Piña, C. 2011 Seroepidemiología de cuatro enfermedades infecciosas en cévidos exóticos en Soto la Marina, Tamaulipas, México. Tesis Maestría. FMVZ, Univ. Veracruzana.
- Bercovich Z. 1998. Maintenance of *Brucella abortus* free herds: A review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. *Vet Quart.* **20**: 81-8
- Bjerkås I, Mohn S.F., Presthus J.1984. Unidentified cystforming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenk* **70**: 271-274.
- Brownlie, J., Clarke, M. C., Howard, C. J., Pocock, D. H. 1987. Pathogenesis and epidemiology of Bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann Rech Vet.* **18**: 157-166.

- Cantú, A., Ortega-S, A., Mosqueda, J., García-Vazquez, Z., Henke, S., George, J. 2008. Prevalence of Infectious Agents in Free-ranging White-tailed Deer in Northeastern Mexico. *J of Wildlife Dis.* **44**(4) pp. 1002-1007.
- Cantú, A., Ortega-S, A., Mosqueda, J., García-Vazquez, Z., Henke, S., George, J. 2008. Prevalence of Infectious Agents in Free-ranging White-tailed Deer in Northeastern Mexico. *J of Wildlife Dis.* **44**(4): 1002-1007.
- Castro H.A., Gonzalez S.R., Prat M.I. 2005. Brucelosis: Una revisión práctica. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* **39** (2): 203-16.
- Contreras J., Mellink E., Martinez R., Medina G. 2007. Parásitos y enfermedades del Venado Bura (*Odocoileus hemionus flaginatus*) en la parte norte de la Sierra San Pedro Martir, Baja California, Mexico. *Rev Mex de Mastozool.* **11**:8-20.
- Corbellini L. G., Smith D. R., Pescador C. A., Schmitz M., Correa A., Steffen D. J., and Driemeier D. 2006. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Prev. Vet. Med.* **74**:130–141.
- Deregt, D., Loewen, K. G. 1995. Bovine viral diarrhea virus: Biotypes and disease. *Can Vet J.* **36**: 371-378.
- Dominguez-Díaz D. 2009. Prevalencia y factores de riesgo asociados al virus de la Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBRV), Virus de la diarrea viral bovina, *Leptospira spp.* y *Neospora caninum*, en hatos con sistema vaca-cría del estado de Nuevo León. Tesis Maestría. UANL.

Dubey J.P. & Lindsay D.S. 1996a. A review of *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* **67**: 1-

59

Dubey J.P., Carpenter J.L., Speer C.A., Topper M.J., Uggla A. 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* **192**: 1269-1285.

Dubey J.P., Hollis K., Romand S., et al.1999b. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Int J Parasitol* **29**: 1709-1711.

Dubey J.P., Jenkins M.C., Rajendran C., Miska K., Ferreira L.R., Martins J., Kwok O.C.H., Choudhary S. 2011. Gray Wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* 181(2-4): 382-387.

Dubey J.P., Rigoulet J., Lagourette P., George C., Longeart L., LeNet J.L. 1996b. Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). *J Parasitol* **82**: 338-339.

Dubey J.P., Schares G., and Ortega M.L.M. 2007. Epidemiology and control of Neosporosis and neospora caninum. *Clin Microbiol Rev.* **20**(2): 323-367.

Dubey J.P.1999a.Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol* **84**: 349-367.

Georgieva D., Prelezov P. N. & Koinarski V. Ts. 2006. *Neospora caninum* and neosporosis in animals - a review. *Bulg. J. Vet. Med.* **9** (1): 1-26.

Godfroid J. 2002. Brucellosis in wildlife. *Rev sci tech Off int Epiz.* **21**(2): 277-286.

- Gondim L.F., McAllister M. M., Mateus-Pinilla N. E., Pitt W. C., Mech L. D., Nelson M. E. 2004a. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of Parasitology*. **90**(6): 1361-1365.
- Gondim, L. F. P., McAllister M. M., Pitt W. C., and Zemlicka D. E. 2004b. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J.Parasitol.* **34**:159–161.
- Goyal, S. M., L. D. Mech, and M. E. Nelson. 1992. Prevalence of antibody titers to *Leptospira spp.* in Minnesota white-tailed deer. *Journal of Wildlife Diseases* 28: 445–448.
- Haigh, J. C., Mackintosh, C., Griffin, F. 2002. Viral, parasitic and prion diseases of farmed deer and bison. *Rev sci tech Off int Epiz.* **21**(2): 219-248.
- Houe, H. 1995 Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Food Anim Pract.* **11**(3): 521-547
- Houe, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology.* **64**: 89-107.
- Houe, H. 2005. Risk Assessment. Goyal, S. M., Ridpath, J. F.(Eds). Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and control. Blackwell Publishing: Ames, Iowa, U.S.A. **2**: 35-64.
- Innes E. A., Wright S., Bartley P., Maley S., Macaldowie C., Esteban- Redondo I., and Buxton D.. 2005. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **108**:29–36.

- Jones R.L., Tamayo R.I., Porath W., Geissman N., Selby L.S. Buening G.M. 1983. A serologic survey of brucellosis in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Missouri. *J Wildl Dis.* 19: 321-323.
- Kabagambe E.K., Elzer P.H., Geaghan J.P., Opuda-Asibo J, Scholl D.T., Miller J.E. 2001. Risk factors for *Brucella* seropositivity in goat herds in eastern and western Uganda. *Preventive Veterinary Medicine.* **52**(2): 91–108
- King, J.S., Slapeta, J., Jenkins, D.J., Al-Qassab, S.E., Ellis, J.T., Windsor, P.A. 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal of Parasitology.* **40**(8):945-950
- Létora, W. J. 2003. Diarrea viral bovina: actualización. *Rev Vet.* **14** (1): 42-51.
- Levett P.N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews.* **14**(2): 296-326.
- Lindberg, A. L. E. 2003. Bovine viral Diarrhoea virus infections and its control. A review. *Veterinary Quarterly,* **25**(1): 1-16.
- Lindsay D.S., Little S.E., Davidson W.R.2002. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*, from the Southeastern United States. *J Parasitol* **88**: 415-417.
- Mackintosh C., Haigh J.C. & Griffin F. 2002. Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Rev sci tech int Epiz.* **21**(2): 249-263.
- Mackintosh C., Haigh J.C. & Griffin F. 2002. Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Rev sci tech int Epiz.* **21**(2): 249-263.

- Mandujano, S., Delfín-Alfonso, C. A., Gallina, S. 2010. Comparison of geographic distribution models of white-tailed deer *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) subspecies in Mexico: biological and management implications. *THERYA*, Vol. 1(1): 41-68
- Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2008. (Disponible en internet).
- Martínez A., Salinas A., Martínez F., Cantú A., Miller D. K. 1999. Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from Mexico. *J of Wildlife Dis.* **35**(4): 790-803.
- Matope G, Bhebhe E, Muma JB, Oloya J, Madekurozwa RL, Lund A, Skjerve E. 2011. Seroprevalence of brucellosis and its associated risk factors in cattle from smallholder dairy farms in Zimbabwe. *Trop Anim Health Prod.* **43**(5):975-82.
- McAllister M.M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A., McGuire A.M. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* **28**: 1473-1478.
- Merien F., Baraton G., Perolat P. 1995. Comparison of Polymerase Chain Reaction with Microagglutination Test and culture for Diagnosis of Leptospirosis. *Journal of Infectious Diseases.* **172**: 281-5.
- Mohammed F.U., Ibrahim S., Ajogi I., Olaniyi B.J.O. 2011. Prevalence of Bovine Brucellosis and Risk Factors Assessment in Cattle Herds in Jigawa State. *ISRN Veterinary Science*. Article ID 132897, 4 pages (*artículo obtenido de internet*).
- Moore C.G., Schnurrenberger P.R. 1981. A review of naturally occurring *Brucella abortus* infections in wild mammals. *J Am Vet Med Assoc.* **179**: 1105-1112.

- Mugaby, R. 2012. Brucellosis Epidemiology, virulence factors, control and molecular targets to prevent bacterial infectious diseases. Thesis for the degree of Master of Science, North Dakota State University, North Dakota, USA.
- Muma J.B., Samui K.L., Oloya J., Munyeme M., Skjerve E. 2007. Risk factors for brucellosis in indigenous cattle reared in livestock–wildlife interface areas of Zambia. *Preventive Veterinary Medicine* 80 (4): 306–317.
- Nettleton, P. F., Entrican, G. 1995. Ruminant Pestiviruses. *Br Vet J.* **151**: 615-642.
- Nowak, R.M. 1999. Walker's mammals of the world. Sixth edition. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, EUA. 2: 1114-1118.
- Omer M.K., Skjerve E., Holstad G., Woldehiwet Z., Macmillan A.P. 2000. Prevalence of antibodies to *Brucella* spp. in cattle, sheep, goats, horses and camels in the State of Eritrea; influence of husbandry systems. *Epidemiology and Infection* **125**:447–453.
- Passler T, Ditchkoff S., Givens M., Brock K., DeYoung R., Waltz P. 2010. Transmission of bovine viral diarrhoea virus among white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet Res* 41:20.
- Passler, T., Walz, H. L., Ditchkoff, S. S., Brock, K. V., Walz, P. H. 2012. Distribution of Bovine Viral Diarrhoea Virus Antigen in Persistently Infected White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *J Comp Path.* **147**: 533-541.
- Passler, T., Walz, P. H., Ditchkoff, S. S., Brock, K. V., DeYoung, R. W., Foley, A. M., Givens, M. D. 2009. Cohabitation of pregnant white-tailed deer and cattle

- persistently infected with Bovine viral diarrhea virus results in persistently infected fawns. *Veterinary Microbiology*. **134**: 362-367.
- Pogranichniy R, Raizman E, Thacker H., Stevenson G.2008. Prevalence and Characterization of bovine diarrhea virus in the white-tailed deer population in Indiana. *J Vet Diagn Invest* **20**: 71-74.
- Reyna-Medrano, M. I. 2012. El Sistema de Unidades de Conservación, Manejo y Aprovechamiento de la Vida Silvestre (SUMA), como una herramienta e instrumento de gestión ambiental en México. XIV Seminario sobre venado cola blanca. Guadalupe, N. L., México. pp: 1-13.
- Ridpath, J. F. 2003 BVDV genotype and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*. **31**:127-131.
- Rinaldi L., Fusco G., Musella V., Veneziano V., Guarino A., Taddei R., and Cringoli G. 2005. *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. *Vet. Parasitol.* **128**:219–230.
- Rocha T. 1998. A review of leptospirosis in farm animals in Portugal. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* **17**: 699-712.
- Rondón, I. 2006. Diarrea Viral Bovina: Patogénesis e inmunopatología. *Rev MVZ Córdoba.* **11**(1): 694-704.
- Schares G., Bärwald A., Staubach C., Ziller M., Klöss D., Schroder R., Labohm R., Dräger K., Fasen W., Hess R. G., and Conraths F. J.. 2004. Potential risk factors

for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology* **129**:301–309.

SEMARNAT, CONAFOR .Manual técnico para beneficiarios: Manejo de vida silvestre. 2009. Primera edición. México.

Spickler, Anna Rovid. Leptospirosis. Mayo 2005. At <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>

Tessaro S.V. 1986. The Existing and Potential Importance of Brucellosis and Tuberculosis in Canadian Wildlife: A Review. *Can Vet J.* **27**: 119-124.

Thilsted J.P. y Dubey J.P. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diag Invest.* **1**:205-209.

Vado-Solís, I., Cárdenas-Marrufo, M. F., Jiménez-Delgadillo, B., Alzina-Lopez, A., Laviada-Molina, H., Suarez-Solís, V., Zavala-Velázquez, J. E. 2002. Clinical-epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán, México. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* **44**(6): 335-340.

Van der Broek A.H.M., Thursfield M.V., Dobbie G.R. Ellis W.A. 1991. A serological and bacteriological survey of leptospira infections in dogs in Edimburg and Glasgow. *J Small Anim Pract.* **32**: 118-124

Villarreal, J. G. 1999. Venado Cola Blanca: Manejo y Aprovechamiento Cinegético. Segunda edición. Unión Ganadera Regional de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México.

Wolf, K., DePerno, C., Jenks, J., Stoskopf, M., Kennedy-Stoskopf, S. 2008. Selenium Status and Antibodies to Selected Pathogens in White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) in Southern Minnesota. *J of Wildlife Dis.* **44**(1): 181-187.

Woods L. W., Anderson M. L., Swift P. K., Suerlow K. W. 1994. Systemic Neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *Jou Vet Diagn Invest.* **6**:508-510.

Apéndice. Distribución de las muestras en las placas para la realización de la prueba de seroneutralización para la detección de anticuerpos contra VDVB.

PLACA 1

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	DVU							CC
2	DVU							CC
3	DVU							CC
4	DVU							CC
5	CP	CP						
6	CP	CP						
7	CN	CN						
8	CN	CN						
9	SP1	SP1						
10	SP1	SP1						
11	SP2	SP2						
12	SP2	SP2						
	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243	1:729	1:2187	

PLACAS 2 A 4

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	SP	SP						
2	SP	SP						
3	SP	SP						
4	SP	SP						
5	SP	SP						
6	SP	SP						
7	SP	SP						
8	SP	SP						
9	SP	SP						
10	SP	SP						
11	SP	SP						
12	SP	SP						
	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243	1:729	1:2187	