

## SEROPREVALENCIA DE ENFERMEDADES QUE AFECTAN LA REPRODUCCIÓN DE BOVINOS PARA LECHE CON ÉNFASIS EN NEOSPOROSIS

### Seroprevalence of reproductive diseases that affect dairy cattle with emphasis on neosporosis

Juan José Ojeda-Carrasco<sup>1\*</sup>, Enrique Espinosa-Ayala<sup>1</sup>, Pedro Abel Hernández-García<sup>1</sup>, Carmen Rojas-Martínez<sup>2</sup>, Jesús Antonio Álvarez-Martínez<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario Amecameca. Carretera Amecameca-Ayapango Km 2.5, CP. 56900 Amecameca, Estado de México, México.

<sup>2</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP. Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8354 Col. Progreso, CP. 62550, Jiutepec, Morelos. México.

\*Autor de correspondencia: jjojedac@uaemex.mx, mvz ojeda@hotmail.com

**Nota científica**      **recibido:** 04 de marzo de 2015, **aceptado:** 20 de mayo de 2015

**RESUMEN.** El objetivo fue estimar la seroprevalencia de neosporosis, diarrea viral bovina, rinotraqueítis infecciosa bovina, brucelosis y leptospirosis; así como, determinar su asociación con el antecedente de aborto e identificar los factores de riesgo. Mediante un estudio de casos y controles de 29 unidades de producción, se seleccionaron 57 vacas con antecedente de aborto y 121 controles. Se analizaron por serología y fetos abortados por PCR para *N. caninum*. Excepto para brucelosis, se detectaron vacas seropositivas correspondiendo la mayor seroprevalencia a *N. caninum* (51.7 %) y la menor (11.8 %) para Leptospirosis. 11.8 % de las vacas fueron seropositivas a *N. caninum* y diarrea viral bovina de manera simultánea, presentando el 100% de ellas registros de al menos un aborto. Se comprobó la presencia de ADN de *N. caninum* en un feto, concluyéndose que *N. caninum* es causa determinante en la presentación de aborto en el sistema de producción de leche en pequeña escala.

**Palabras clave:** Enfermedades abortivas, factores de riesgo, neosporosis, pequeña escala, seroprevalencia

**ABSTRACT.** The objective of this article was to estimate the seroprevalence of neosporosis, bovine viral diarrhea, infectious bovine rhinotracheitis, brucellosis, and leptospirosis, as well as to determine their association with the history of miscarriage and to identify the risk factors. By means of a case-control study of 29 production units, 57 cows with a history of miscarriage were selected alongside another 121 cows as controls. These cows were analyzed by serology and the aborted fetuses were analyzed by PCR for *N. caninum*. Except for brucellosis, cows were detected seropositive with the most seroprevalence corresponding to *N. caninum* (51.7 %) and the least seroprevalence corresponding to leptospirosis (11.8 %). 11.8 % of the cows were simultaneously seropositive for *N. caninum* and bovine viral diarrhea, with 100% of them showing records of at least one miscarriage. The DNA presence of *N. caninum* in one fetus was proven, concluding that *N. caninum* is a determinant cause in the occurrence of miscarriage in the milk production system on a small scale.

**Keywords:** Abortifacient diseases, risk factors, neosporosis, small scale, seroprevalence

## INTRODUCCIÓN

El aborto, es una de las principales causas que afecta la economía y competitividad de la producción lechera (Selim et al. 2014), se considera normal una tasa de 2 a 6.5 % al año (Forar et al.

1995). Determinar la causa del aborto es complejo, y sólo se puede identificar entre 25 y 40 % de las veces, aun cuando se cuente con muestras del feto, pero se sabe que los agentes infecciosos pueden estar involucrados hasta en 90 % de las veces (Yang et al. 2012). En México, más del 70 % de los abortos

se clasifican como de origen desconocido (Escamilla et al. 2007). Cuando no se dispone de tejido fetal para los análisis de laboratorio, el diagnóstico se realiza por medio de pruebas serológicas con las que se detectan anticuerpos circulantes contra agentes infecciosos como *Neospora caninum*, el virus de la diarrea viral bovina (DVB) y de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), brucelosis y leptospirosis. Sin embargo, una de las principales limitantes de este tipo de determinaciones es que es difícil diferenciar entre los anticuerpos producidos por la inmunización y los estimulados por la infección natural (Abas et al. 2014). A partir de información de seroprevalencias obtenidas de ganado sano y de vacas con problemas de abortos, es posible precisar la probabilidad relativa de aborto y la proporción de abortos atribuibles a una enfermedad en específico (Thrusfield 2007). En particular, se sabe que *N. caninum* es un protozoo de relevancia en la producción de abortos a nivel mundial y aunque se desconoce el impacto económico global que produce, existen investigaciones en las que se atribuyen pérdidas de entre 20 y 110 dólares en vacas productoras de leche infectadas durante la gestación (Reichel et al. 2013).

En México 78.6 % de las unidades de producción tienen menos de 30 vacas, las cuales representan 34.7 % del inventario de bovinos productores de leche, que a su vez aportan 25.5 % de la producción nacional (INEGI 2007). Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue estimar la seroprevalencia de neosporosis, DVB, IBR, brucelosis y leptospirosis; para determinar su asociación con el antecedente de aborto e identificar los factores de riesgo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio de estudio

El trabajo se realizó en los municipios de Amecameca, Tlalmanalco y Ayapango en el suroriente del Estado de México, a una altura promedio de 2 420 msnm. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano Cb (w2), temperatura media de 12 a 18 °C y precipitación pluvial de 935 mm al año (INEGI 2008).

### Selección de las unidades de producción de leche (UPL)

De 149 UPL totales, se seleccionaron 29 mediante un muestreo doble estratificado por conveniencia, el primer estrato correspondió a la representación proporcional de cada municipio y el segundo, al número de animales en lactación (I) 3-7 vacas, (II) 8-15 vacas y (III) más de 16 vacas (Espinoza-Ortega et al. 2007). El manejo reproductivo, nutricional y sanitario se efectuó de acuerdo con el productor. Para cada UPL se levantó una encuesta con el propósito de identificar factores de riesgo individual y de hato, relacionados con la presentación de aborto.

### Tamaño de muestra

Se empleó un diseño de casos y controles, a partir de un total de 331 vacas; se seleccionaron 178, cada animal con antecedente de aborto fue un caso (n=57) y los controles fueron aquellas vacas sin historial de abortos (n=121) (Mateu y Casal 2003).

### Muestreo

De cada animal se recolectó una muestra sanguínea por punción de la vena coccígea en tubos sin anticoagulante, posteriormente se centrifugó a 1000 x g por 15 min, se separó el suero y se colocó en viales de poliestireno para guardar a -20 °C hasta su uso.

### Pruebas serológicas

Para la detección de anticuerpos específicos para *N. caninum*, DVB e IBR se utilizó el ensayo inmunoenzimático (ELISA), cada muestra se trabajó por duplicado empleando paquetes comerciales (HerdCheck anti-*N. caninum*, HerdCheck BVDB y HerdCheck IBR-gB. IDEXX<sup>TM</sup>-Laboratories Inc., Westbrook, Maine USA). Se usó un lector BIO-RAD con lectura de absorbancia de 650 nm para *N. caninum* y de 450 nm para DVB e IBR. Los procedimientos y punto de corte se efectuaron de acuerdo al fabricante. La presencia de anticuerpos para *Leptospira* spp. se verificó con la prueba de microaglutinación (MAT) con una batería de

10 serovariedades de referencia internacional y tres de aislamientos nacionales; se consideraron como positivos títulos mayores o iguales a 1:100 (Salgado *et al.* 2014). Para el diagnóstico de brucelosis se utilizó la prueba de aglutinación en placa con rosa de bengala y la de Rivanol como prueba confirmatoria (NOM-041-ZOO-1995). El criterio para considerar como aborto fue la pérdida de la preñez entre los 42 y 260 d de gestación.

### Diagnóstico molecular para neosporosis

Para el diagnóstico se emplearon tres fetos de los cuales se obtuvieron 25 mg de tejido cerebral, renal e hígado fetal; se realizó la extracción del ADN con un paquete comercial (Ultra Clean, MoBio Lab<sup>TM</sup>, USA). Se practicó el ensayo de PCR semi-anidado con secuencias iniciadoras publicadas previamente Np4 (5' CCTCCCAATGCGAACGAAA3'), Np7 (5' GGGTGAACCGAGGGAGTTG3') y en el formato semianidado se incluyeron Np6 (5' CAGTCAACCTACGTCTTCT3') y Np7. Por cada muestra se emplearon 43  $\mu$ L de la mezcla comercial (PCR Master Mix, Promega<sup>TM</sup>, USA), a la que se le agregaron 5  $\mu$ L de ADN blanco y 1  $\mu$ L de cada iniciador. El protocolo de amplificación fue de 95°C por 2 min para pre desnaturalización; 95°C por 30 s para desnaturalización, 57°C por 30 s para alineamiento y 72°C por 60 s para la extensión por 35 ciclos y la extensión final a 72°C por 3 min. Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1.8 % teñido con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta (UV). El tamaño esperado del amplicón fue de 275 pares de bases (pb) (Bazler *et al.* 1999).

### Análisis estadístico

Los valores de prevalencia del grupo de vacas con aborto y del grupo control fueron comparados mediante Ji cuadrada con corrección de Yates. Para medir la fuerza de asociación entre seropositividad y antecedente de aborto se calculó la oportunidad relativa con intervalos de confianza (IC) del 95 %, donde valores mayores a uno indicaron asociación (Thrusfield 2007). La fracción atribuible poblacional ( $\lambda_{fp}$ ) se determinó usando el método para

estudios de casos y controles, asumiendo que el grupo control fue representativo para la población en estudio (Gordis 2005). Los factores evaluados de riesgo individual y de hato se consideraron como variables dicotómicas, excepto en las que se hizo descripción de la variable. Los factores individuales fueron: resultado serológico de positividad o negatividad a neosporosis, DVB, IBR, brucelosis y leptospirosis; número de enfermedades a las que fueron positivos los animales (1, 2, > 3); antecedente de aborto, número de abortos y número de partos (1, 2, > 3). Los factores de hato fueron: procedencia de los reemplazos, presencia de perros en el establo, antecedentes de vacunación, encharcamientos en las instalaciones y tipo de servicio. El análisis inicial se realizó mediante Ji cuadrada y en aquellas en que el factor de riesgo fue significativo ( $p < 0.05$ ), se procesaron con regresión logística por el procedimiento LOGISTIC del programa SAS versión 9.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de hembras en edad reproductiva en las UPL fue de 4 a 49, promedio de 11.4; con rango de edad de 1 a 13 años ( $4.7 \pm 2.4$  años), con 0 a 10 partos con media de  $2.3 \pm 1.8$  partos. El reducido tamaño del hato indica que las UPL pertenecen al sistema de producción de leche de pequeña escala. En ninguna de las UPL se realizan programas preventivos de inmunización contra los principales agentes etiológicos relacionados con abortos.

Se detectó la presencia de anticuerpos de agentes relacionados con la producción de abortos en bovinos (Tabla 1); sin embargo, es conveniente considerar que en este tipo de estudios, los resultados serológicos dependen de la prevalencia de la infección en un contexto de temporalidad y distribución espacial definida, así como de la persistencia de anticuerpos circulantes en el animal, las tasas de sensibilidad y especificidad epidemiológicas de las pruebas empleadas. La prevalencia de *N. caninum* fue de 51.7 %, lo cual es similar a lo reportado por Morales *et al.* (2001). En sis-

temas especializados, también, se ha encontrado alta prevalencia en ganado lechero de los estados de Coahuila y Aguascalientes (Salinas *et al.* 2005, Meléndez *et al.* 2010); lo que difiere de lo encontrado en ganado *Bos indicus* en el trópico húmedo en el que se reporta una prevalencia de 8 a 15 % (García-Vázquez *et al.* 2009); mientras que en vacas con antecedentes de aborto se reporta una prevalencia del 20 % (Montiel-Peña *et al.* 2011). Lo encontrado en el presente estudio para *N. caninum* evidencia un comportamiento similar entre el sistema de producción en pequeña escala e intensivos (Morales *et al.* 2001, Gavrea *et al.* 2011). La prevalencia de 46.6 % para DVB, contrasta con lo reportado por Moles *et al.* (2002), quienes reportan una prevalencia del 72.3 % en bovinos lecheros, al respecto se sabe que este virus induce inmunosupresión y se asocia con la disminución en la productividad, pérdidas reproductivas y predisposición a la infección por otros agentes como lo es el caso de la neosporosis (Dubey *et al.* 2007); asimismo puede ocurrir muerte fetal, aborto, momificación y nacimiento de becerros inmunotolerantes (Brodersen 2014). En el presente estudio se observó que 11.8 % de las vacas fueron seropositivas para *N. caninum* y DVB, presentando 100 % de estas vacas con al menos un aborto. Para IBR, 18 % de los animales fueron seropositivos, lo cual coincide con Magaña-Urbina *et al.* (2005) quienes reportan una tasa del 22 % en bovinos de traspatio. En el caso de *Leptospira* spp. se estimó una prevalencia del 11.8 %, lo que es similar a lo reportado por León *et al.* (2008); mientras que el 47.6 % de las vacas positivas presentaron anticuerpos contra la serovariedad *L. hardjo*; también se detectó la presencia de las serovares *L. canícola*, *L. icterohemorragiae*, *L. wolffi* y *L. pyrogenes*. No se encontraron anticuerpos contra *B. abortus* en las vacas muestreadas, aunque existe un programa nacional para su control, en el ganado estudiado no se realizan actividades preventivas, ni de control contra la brucelosis, lo cual contrasta con lo reportado a nivel nacional y para el Estado por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) (2013).

Al comparar las vacas con antecedente de

aborto y el grupo control para *N. caninum*, DVB, IBR, brucelosis y leptospirosis, sólo se encontraron diferencias significativas para *N. caninum* ( $P = 0.00001$ ) con un OR = 5.15 (IC 95 %: 2.06, 12.86) y la fracción poblacional ( $\lambda_{fap}$ ) de 0.232 (Tabla 2); el OR indicó que el ganado seropositivo a *N. caninum* y con antecedente de aborto, tuvo 5.1 veces más posibilidad de abortar que el ganado no infectado (García-Vázquez *et al.* 2005, González-Warleta *et al.* 2007). La fracción atribuible poblacional para *N. caninum* indicó que 23.2 % de los abortos en el ganado bajo estudio pueden ser atribuidos a este parásito, por lo que este porcentaje de abortos puede disminuir si el parásito se controla o erradica.

El análisis de los factores de riesgo individual, mediante Ji cuadrada mostró asociación entre las vacas con antecedente de aborto y la presencia de anticuerpos para *N. caninum* ( $p < 0.05$ ). De forma similar, entre la seropositividad simultánea a *N. caninum* y DVB, para los factores de riesgo de hato, se encontró asociación entre antecedente de aborto y la presencia de perros en el establo OR = 13.07 (IC 95 %: 4.7; 36) ( $p = 0$ ); o bien, con la presencia de encharcamientos en las instalaciones OR = 0.46 (IC 95 %: 0.91; 1.07) ( $p = 0.0315$ ). El análisis de regresión logística, no detectó asociación entre los factores individuales y de hato con la presentación de aborto, lo cual coincide con lo reportado (Bartels *et al.* 2007, Meléndez *et al.* 2010).

Durante el estudio se registraron 43 abortos, la mayor proporción ocurrió en el segundo tercio de gestación, seguido por el primero y último tercio (60.5 %, 20.9 %, 18.6 %, respectivamente). De tres fetos abortados de vacas seropositivas a *N. caninum*, se obtuvieron porciones de encéfalo, riñón e hígado; en el encéfalo de uno de ellos se identificó el ADN de *N. caninum* (Figura 1); lo que sugiere una infección activa por la transmisión vertical de la vaca a la cría y horizontal del perro a la vaca, lo cual permite mantener el ciclo del parásito, por lo que es necesario realizar más investigación sobre este tema (Bartels *et al.* 2007, Montiel-Peña *et al.* 2011).

Se concluye que existe la presencia de los agentes etiológicos de DVB, IBR, neosporosis, y

**Tabla 1.** Estatus serológico de algunas enfermedades asociadas con aborto en vacas lecheras de tres municipios del Estado de México.

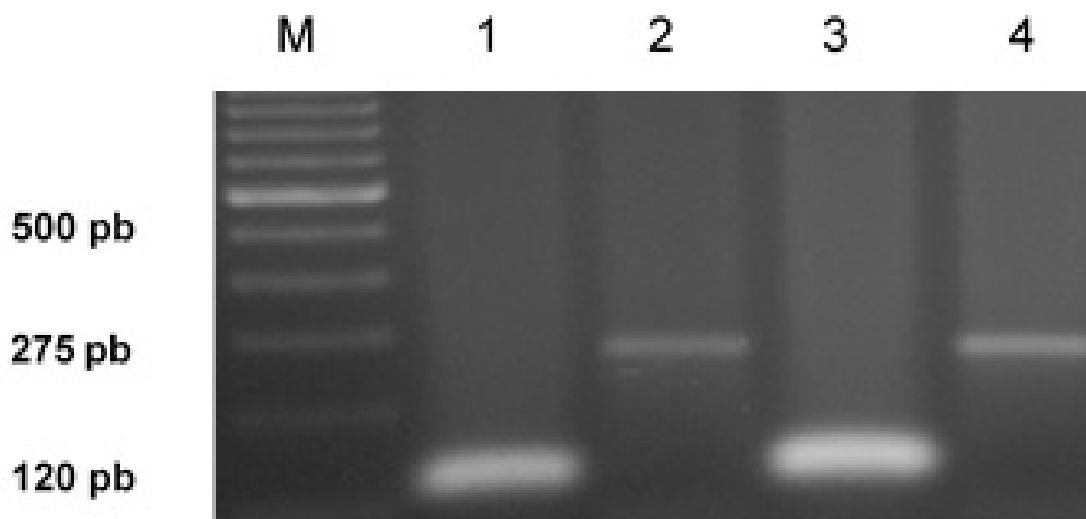
Municipio	Número Vacas	<i>n. caninum</i>		DVB		IBR		Br		Lept	
		<i>N</i>	%	<i>N</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Tlalmanalco	40	23	57.5	16	40.0	9	22.5	0	0	4	10.0
Amecameca	91	46	50.5	53	58.2	20	22.2	0	0	8	8.8
Ayapango	47	23	48.9	14	29.8	3	6.4	0	0	9	19.1

*N. caninum*, (DVB) diarrea viral bovina, (IBR) rinotraqueítis infecciosa bovina, (Br) brucelosis y (Lept) leptospirosis; *n* número de vacas positivas.

**Tabla 2.** Estimación de la asociación entre seropositividad y antecedente de aborto por neosporosis, DVB, IBR, brucelosis y leptospirosis en vacas de los Municipios de Amecameca, Tlalmanalco y Ayapango del Estado de México.

Agente abortivo	Prevalencia (%)		Odds ratios (OR)	Valores de p para $\chi$	$\lambda_{fap}$
	Casos (vacas con aborto)	Grupo control			
<i>N. caninum</i>	24.7±8.1	7.3±4.9	5.15±4.71	< 0.00001	0.232
DVB	15.7±6.8	16.3±6.9	1.16±0.93	0.766	0.0025
IBR	6.2±4.5	25.8±8.2	1.14±1.17	0.945	0.038
<i>B. abortus</i>	0	0	-	-	-
<i>Leptospira</i> spp.	1.7±2.4	30.3±8.7	0.32±0.51	0.108	-0.259

$\lambda_{fap}$  fracción atribuible poblacional; DVB diarrea viral bovina; IBR rinotraqueítis infecciosa bovina.



**Figura 1.** Productos amplificados por PCR con iniciadores de *n. caninum*. Carriles: M) marcador molecular de 100 pb; 1) cerebro feto control G3PDH; 2) cerebro de feto; 3) Control negativo; 4) Control positivo).

leptospirosis, con amplia distribución en las UPL del sistema familiar de producción de leche, en los municipios bajo estudio del Estado de México. La presencia de *N. caninum* es una causa determinante en la presentación de aborto infeccioso al encontrar un alto porcentaje de vacas seropositivas, al descubrir la presencia de ADN del parásito en un feto

abortado. Este tipo de estudios pueden facilitar la implementación y diseño de programas de prevención y/o control de enfermedades infecciosas para mejorar la competitividad de la actividad pecuaria del sistema familiar de producción de leche.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca para estudios de posgrado. A la Universidad Autónoma del Estado de México por el financiamiento de los proyecto

3161/2012/ESP y DSA/103.5/14/7529 de la SEP. Así como a los productores por las facilidades otorgadas para la realización de la investigación.

## LITERATURA CITADA

- Abas KA, Lichtman AH, Pillai S (2014) Cellular and Molecular Immunology. 8th Edition, Elsevier Saunders, USA. 525p.
- Bartels C, Huinink I, Beiboer M, Van Schaik G, Wouda W, Dijkstra T, et al. (2007) Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in dutch dairy herds. *Veterinary Parasitology* 148: 83-92
- Bazler TV, Gay JC, Long MT, Mathison BA (1999) Detection by PCR of *Neospora caninum* in Fetal Tissues from Spontaneous Bovine Abortions. *Journal Clinical Microbiology* 37: 4059-4064
- Brodersen BW (2014) Bovine viral diarrhoea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Veterinary Pathology* 51: 453-464.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM (2007) Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 323-367
- Escamilla HP, Martínez MJJ, Medina M, Morales SE (2007) Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 71: 314-317
- Espinoza-Ortega A, Espinosa-Ayala E, Bastida-López J, Castañeda-Martínez T, Arriaga-Jordán CM (2007) Small-scale dairy farming in the highlands of central Mexico: technical, economic and social aspects and their impact on poverty. *Experimental Agriculture* 43: 241-256
- Forar AL, Gay JM, Hancock DD (1995) The frequency of endemic fetal loss in dairy cattle: a review. *Theriogenology* 43: 989-1000.
- García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Ramos-Aragón A, Cruz-Vázquez C, Mapes-Sánchez G (2005) *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Veterinary Parasitology* 134: 61-65.
- García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Mejía-Estrada F, Rodríguez-Vivas I, Romero-Salas D, Fernández-Ruvalcaba M, et al. (2009) Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in beef cattle in three southern states of Mexico. *Tropical Animal Health and Production* 41: 749-753.
- Gavrea RR, Iovu A, Losson B, Cozma V (2011) Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle from north-west and centre of Romania. *Parasite* 18: 349-351
- González-Warleta M, Castro-Hermida MJA, Carro-Corral C, Cortizo-Mella J, Mezo M (2008) Epidemiology of neosporosis in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Parasitology Research* 102: 243-249.
- Gordis L (2005) Epidemiología. Tercera Edición. Elsevier, España. 336p.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2007) Censo Agrícola, Ganadero y Forestal. <http://www.inegi.org.mx>. Fecha de consulta 23 de febrero de 2014.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2008) Anuario Estadístico del Estado de México. <http://cuencavalledemexico.com/informacion/estatal/estado-de-mexico/medio-natural/>. Fecha de consulta 16 de junio de 2014.

- León LL, García RC, Díaz CO, Valdez RB, Carmona GC, Velázquez BL (2008) Prevalence of leptospirosis in dairy cattle from small rural production units in Toluca Valley, State of Mexico. *Annals New York Academic Science* 1149: 292-295
- Magaña-Urbina A, Solorio-Rivera JL, Segura-Correa JC (2005) Rinotraqueítis infecciosa bovina en hatos lecheros de la región Cutzio-Téjaro, Michoacán, México. *Técnica Pecuaria México* 43: 27-37
- Mateu E, Casal J (2003) Tamaño de la muestra. *Revista de Epidemiología y Medicina Preventiva* 1: 8-14
- Meléndez RM, Valdivia AG, Rangel EJ, Díaz E, Segura-Correa JC, Guerrero AL (2010) Factores de riesgo asociados a la presencia de aborto y desempeño reproductivo en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1: 391-401.
- Moles LP, Gavaldón D, Torres JI, Cisneros MA, Aguirre J, Rojas N (2002) Seroprevalencia simultanea de Leptospirosis y tres enfermedades de importancia reproductiva en bovinos del altiplano central de la República Mexicana. *Revista Salud Animal* 24: 106-110
- Montiel-Peña T, Romero-Salas D, García-Vázquez Z, Medina-Esparza L, Cruz-Vázquez C (2011) Bovine neosporosis in cattle farms from the northern region of the state of Veracruz, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13: 469-479
- Morales E, Trigo FJ, Ibarra F, Puente E, Santacruz M (2001) Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 13: 413-415
- NOM-041-ZOO-1995. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. *Diario Oficial*. México, DF. 22p.
- Reichel MP, Ayanequi-Alcérreca MA, Gondim LF, Ellis JT (2013) What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. *International Journal for Parasitology* 43: 133-142
- Salgado M, Otto B, Sandoval E, Reinhardt G, Boqvist S. (2014) A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile. *BMC Veterinary Research* 10: 126.
- Salinas MJA, Mora GJJ, Zárate RJJ, Riojas VVM, Hernández VG, Dávalos AG, Ramírez RR, Galán ALC, Ávalos RR (2005) Frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en ganado bovino del noreste de México. *Veterinaria México* 36: 303-311.
- Selim AM, Elhaig MM, Gaede W (2014) Development of multiplex real-time PCR assay for the detection of *Brucella* spp., *Leptospira* spp. and *Campylobacter foetus*. *Veterinaria Italiana* 50: 269-275.
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, SAGARPA (2013) Frecuencia en hatos de Brucelosis en los Estados de la República Mexicana. Periodo Julio-Diciembre, 2013. [www.senasica.gob.mx](http://www.senasica.gob.mx). Fecha de consulta 23 de septiembre de 2014.
- Thrusfield M (2007) *Veterinary Epidemiology*, Third Edition. London: Blackwell Science. Blackwell Publishin Company. 610p.
- Yang N, Cui X, Qian W, Yu S, Liu Q. (2012) Survey of nine abortifacient infectious agents in aborted bovine fetuses from dairy farms in Beijing, China, by PCR. *Acta Veterinaria Hungarica* 60: 83-92.