

10
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“PRODUCCION BOVINA” VALORES
HEMATOLOGICOS EN VACAS HOLSTEIN
SEROPOSITIVAS A *Neospora caninum* DE LA
CUENCA LECHERA DE TIZAYUCA, HIDALGO.

INFORME DE SERVICIO SOCIAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
PABLO CALZADA CALZADA

ASESORES:
M. EN C. FERNANDO OSNAYA GALLARDO.
M.V.Z. JAVIER HERNANDEZ BALDERAS. ✓
M.V.Z. JESUS GUEVARA VIVERO.
M.V.Z. JOSE A. LICEA VEGA.
M.V.Z. RAFAEL PEREZ GONZALEZ. ✓

ASESORES EXTERNOS: M.V.Z. CARLOS GARCIA ORTIZ.
M.V.Z. ELIZABETH MORALES SALINAS. ✓
M.V.Z. GERARDO F. QUIROZ ROCHA.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1999.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

270115



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de:

"Producción bovina" Valores hematológicos en vacas Holstein seropositivas a
Neospora caninum de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo.

que presenta el pasante: Calzada Calzada Pablo
con número de cuenta: 9361958 - 1 para obtener el TÍTULO de
Médico Veterinario Zootecnista

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 4 de Noviembre de 1983

PRESIDENTE	<u>MVZ. R JAVIER HERNANDEZ BALDERAS</u>
VOCAL	<u>MVZ. MIGUEL ANGEL PEREZ ORTEGA</u>
SECRETARIO	<u>MVZ. RAFAEL PEREZ GONZALEZ</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. GERARDO GARZA MALACARA</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. MARIA GUADALUPE MONDRAGON OLVERA</u>

DEDICATORIAS

A mis abuelos: Epifania Vera ^(†), Margarito Calzada, Luisa Almazán^(†) y Bonifacio Calzada^(†), por haber sido la base de una gran familia.

A mis padres: Ofelia Calzada y Pablo Calzada; por darme la vida y enseñarme el camino correcto.

A mis Hermanos: Petra, Eva, Javier, Martín y Remedios Calzada Calzada; por su confianza y su desinteresado apoyo.

A Tere Lemus; por su incansable entusiasmo, fuerza y esperanza, por estar junto a mí a pesar de todas las adversidades, pero sobre todo por alentarme a ser mejor cada día.

AGRADECIMIENTOS

A Dios; por permitirme llegar a esta meta.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México; por haber permitido mi formación profesional.

A mis asesores: MVZ. Carlos García, MVZ. Javier Hernández, MVZ. Rafael Pérez, MC. Fernando Osnaya y especialmente al MVZ. Gerardo F. Quiroz y MVZ. Elizabeth Morales; por dedicarme su tiempo y por su paciencia.

A mis amigos de la Universidad, que me brindaron su amistad sincera e incondicional ; especialmente a Victor Cruz, por compartir conmigo ideas y conocimientos.

A GIPEB, S.C.; especialmente al MVZ. Ricardo Cedillo, MVZ Marco A. Oropeza y al MVZ. Mario Santa Cruz; por la ayuda brindada en el desarrollo de este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la elaboración de este trabajo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVO ACADÉMICO	13
OBJETIVO SOCIAL	14
HIPÓTESIS	15
DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES	16
CUADRO METODOLÓGICO	17
RESULTADOS, EVALUACIÓN Y/O ANÁLISIS	20
CONCLUSIONES	21
RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS	22
BIBLIOGRAFÍA	23

INTRODUCCIÓN

En muchas ocasiones se ha afirmado que uno de los objetivos principales del programa gubernamental, es lograr la autosuficiencia en la producción de leche en nuestro país

La producción de leche en México en 1997 fue aproximadamente de 7,848.105 millones de litros mediante el aprovechamiento de 5.9 millones de vacas de distintas características genéticas y bajo diferentes sistemas de explotación. También se ha observado una disminución del hato lechero, se estima que el número de cabezas disminuyó de 6.6 millones en 1981 a 5.5 millones en 1992.^{1,2}

Hasta el mes de julio de 1998, la producción nacional de leche de bovino se ubicó en 4,614.288 millones de litros, representando un aumento del 5.3 % con respecto al mismo lapso del año de 1997, que fue de 4,215.140 millones de litros.¹ En el cuadro 1 se indica la producción nacional de leche de bovino, desde 1990 hasta 1997.

CUADRO 1 PRODUCCIÓN NACIONAL DE LECHE DE BOVINO

Año	Miles de litros
1990	6,717.115
1991	6,141.545
1992	6,966.210
1993	7,404.078
1994	7,320.213
1995	7,398.598
1996	7,586.422
1997	7,848.105

FUENTE: Boletín Mensual de Leche. SAGAR Julio 1998; VI (7).

Los estados con mayor avance en la producción de leche fresca hasta el mes de Julio de 1998 son: Jalisco, que destaca con 686.6 millones de litros, lo que representa el 14.9 % del total nacional; seguido por: Durango con 478.5 millones y 10.4 %, Coahuila 454.8 y 9.9; Chihuahua 378.9 y 8.2; Guanajuato 369.9 y 8.1 y Veracruz con 266.9 millones de litros y una participación porcentual de 5.8 del total nacional; los que en conjunto contribuyen con 2,635.5 millones de litros que representan el 57.1 % de la producción total del país.¹

En cuanto a las exportaciones de productos lácteos, resalta, en el reporte al mes de Marzo de 1998 proporcionado por el INEGI, el aumento del 118.9% con relación al mismo mes del año previo en el rubro de las demás leches, natas y cremas, que se ubicó en poco más de 1,257.0 toneladas.¹

Por su parte, el INEGI reportó para el mes de referencia, en cuanto a las importaciones de leche en polvo, un volumen acumulado de 73.4 mil toneladas, 11 % menor a la importación de 1997, con valor de 126.9 millones de dólares, lo que representó una disminución del 15.6% con respecto al mismo periodo del año anterior. Asimismo, cabe señalar la disminución del 32.5 % con relación al año previo, en la importación de grasa butírica deshidratada, lo que significó una reducción del 25% en valor.¹ En el cuadro 2 se indica la situación lechera reciente en México.

CUADRO 2 SITUACIÓN LECHERA RECIENTE EN MÉXICO

Millones de litros	1995	1996	1997
Consumo	10,196	10,656	11,272
Producción	7,399	7,586	7,848
Importación	2,818	3,137	3,485
Exportación	20	66	61
Consumo percapita (litros)	112	114	114
% de imp/consumo	27.6%	29.4%	30.9%
Población (millones)	91,158	93,258	94.841

FUENTE: Información Económica Pecuaria No. 7 (cifras a Diciembre de 1997) Confederación Nacional Ganadera. 66 - 67.

Por toda esta problemática ya antes analizada se ha forzado al ganadero a establecer sistemas de explotación con un mínimo de mano de obra calificada como es el caso de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo. Por otra parte ha tomado en cuenta factores como la genética, alimentación, sanidad y manejo.

Las enfermedades de los animales continúan siendo un factor que limita el desarrollo del sector pecuario por las pérdidas económicas que ocasionan en el ganado bovino. Por su parte, uno de los problemas que mayormente afectan los parámetros reproductivos y por ende los productivos de una explotación ganadera lo constituyen los abortos. Este se define como la terminación de la preñez con la expulsión de un feto de tamaño reconocible antes de que sea viable lo cual se define de manera arbitraria de los 42 hasta los 260 días de gestación.^{4,5}

Existen diferentes variantes del aborto, por ejemplo: Aborto completo, espontáneo, fallido, habitual, incompleto e inducido.⁶

Muchas enfermedades sistémicas de la madre pueden resultar en aborto aún cuando los órganos reproductores no se vean directamente afectados, en estos casos el aborto puede resultar por una marcada elevación en la temperatura materna, la cual causa hipoxia y acidosis del feto. De la misma forma, infecciones localizadas en cualquier órgano y causadas por organismos Gram negativos pueden resultar en una endotoxemia que produce el aborto debido a la capacidad que tienen las endotoxinas de inducir la síntesis de prostaglandinas F_{2α} en muchos tejidos. Además las endotoxinas causan coagulación intravascular, interfiriendo con la circulación sanguínea a nivel de la placenta.⁷

En caso de infecciones que afectan directamente al feto o a la placenta, el organismo responsable debe llegar primero al útero gestante.⁷

El aborto es sólo un signo clínico de muchas enfermedades, por lo que muchas enfermedades infecciosas que causan aborto presentan además signos clínicos definidos que no tienen relación con la reproducción, pero que nos pueden ayudar en el diagnóstico de las enfermedades.⁸

El aborto está asociado con numerosas causas que se agrupan en dos categorías amplias: infecciosas y no infecciosas. En los cuadros 3 y 4 respectivamente se indican las principales causas infecciosas y no infecciosas de abortos en los bovinos.

CUADRO 3 PRINCIPALES CAUSAS INFECCIOSAS DE ABORTOS EN LOS BOVINOS⁴

BACTERIAS	MES DE PRESENTACIÓN
<i>Brucella abortus</i>	4 - 9
<i>Campylobacter foetus</i>	4 - 7
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	6 - 9
<i>Bacillus</i> sp.	7 - 9
<i>Leptospira</i> sp.	4 - 9
<i>Haemophilus sommus</i>	7 - 9
<i>Listeria monocytogenes</i>	7 - 9
<i>Ureaplasma diversum</i>	7 - 9
<i>Chlamidia</i> sp.	4 - 9
VIRUS	
IBR	4 - 9
Lengua azul	0 - 3
DVB	4 - 9
PI3	Variable
PROTOZOARIOS	
<i>Trichomona foetus</i>	0 - 5
<i>Neospora caninum</i>	3 - 9
HONGOS	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6 - 9
<i>Candida albicans</i>	4 - 6

CUADRO 4 PRINCIPALES CAUSAS NO INFECCIOSAS DE ABORTOS ⁷

Substancias químicas y drogas	(nitratos, nitritos, warfarina)
Hormonales	(altas dosis de estrógenos, corticoesteroides, prostaglandinas)
Nutricionales	(deficiencia y exceso de proteína, deficiencia de vitamina A y E)
Genéticas o cromosómicas	(anomalías fetales, desórdenes genéticos)
Daños físicos	(transporte, cirugías, traumas)
Otros	(alergias, reacciones anafilácticas)

Los abortos tienen una gran repercusión sobre la economía de los hatos. En México se calcula una pérdida de \$8,300.00 un aborto de 135 días de una vaca y de \$7,031.00 el de una vaquilla. ^{5,9}

Las incidencias de abortos reportadas en el ganado bovino lechero son del 2 al 30%. Siendo considerado como aceptable de menos del 5%. En la Cuenca Lechera de Tizayuca Hidalgo, una de las más grandes del país, sé a reportado hasta la fecha una incidencia del 11.01%. ¹⁰

La Neosporosis bovina ha sido una enfermedad que actualmente se ha diagnosticado en nuestro país y en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, SA. (CAITSA) como causa de aborto, provocando una baja de producción láctea, por lo tanto ha sido problema de causa de envío continuo de vacas al rastro.

NEOSPOROSIS BOVINA

Neospora caninum es un protozooario, unicelular del Phylum Apicomplexa, que ha sido reconocido recientemente en los animales, afectando en forma natural a perros, bovinos, ovinos, caprinos y equinos. ^{11,12} Hasta 1988 fue estrechamente relacionado con *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis* sp., los cuales requieren de dos hospedadores o especies animales para completar su ciclo de vida. ^{13,14}

El parásito se encontró por primera vez en 1984 en perros de Noruega, aunque estudios retrospectivos demostraron que el parásito ha sido endémico por lo menos desde 1957. Morales, menciona que el primer aislamiento del parásito de tejidos fetales bovinos, fue realizado por Conrand y col. en Estados Unidos en 1991. ^{15,16}

La Neosporosis bovina se ha diagnosticado en Australia, Nueva Zelanda, Japón, Bélgica, Holanda, Inglaterra, Israel, países escandinavos, Sudáfrica, Sudamérica y Norteamérica. ^{15,17,18,19}

Esta enfermedad se ha considerado como una causa más de abortos en el ganado lechero, teniendo importancia económica por la alta prevalencia. La ineficiencia reproductiva causa aproximadamente \$200 millones de dólares de pérdidas anuales en la industria lechera y cárnica en los Estados Unidos. Además del decremento en la producción de leche, las pérdidas económicas aumentan por provocar el posible reemplazo de vacas seropositivas.^{15,20}

La primera vez que se asoció el aborto a un protozooario parecido a *Neospora caninum* en el ganado lechero, fue en Nuevo México, E.U. en 1987 y en un neonato Shorthorn proveniente de Maryland.²¹ En el cuadro 5 se resumen los informes de aislamientos de *Neospora caninum* a partir de fetos de bovinos en los diferentes países.

CUADRO 5 INFORME DE AISLAMIENTOS DE *Neospora caninum*
A PARTIR DE FETOS ABORTADOS

País	Número de fetos	Meses de gestación
Canadá	2	6 - 8
Dinamarca	2	5 - 7
Israel	3	----
Japón	5	5 - 9
Sudáfrica	2	7
Suecia	1	4 - 5
Estados Unidos de Norteamérica	2	5 - 8

FUENTE: Dubey JP, Lindsay DS. Vet Parasitol 1996;67:1-59.

En el cuadro 6 se resumen el número de casos de aborto bovino asociado a Neosporosis en los diferentes países.

CUADRO 6 LISTA DE ABORTO BOVINO EPIZOOTICA ASOCIADO A NEOSPOROSIS

País	Número de casos
Australia	155
Irlanda	16
México	6
Holanda	554
Nueva Zelanda	2
Estados Unidos de Norteamérica	390
Inglaterra	8

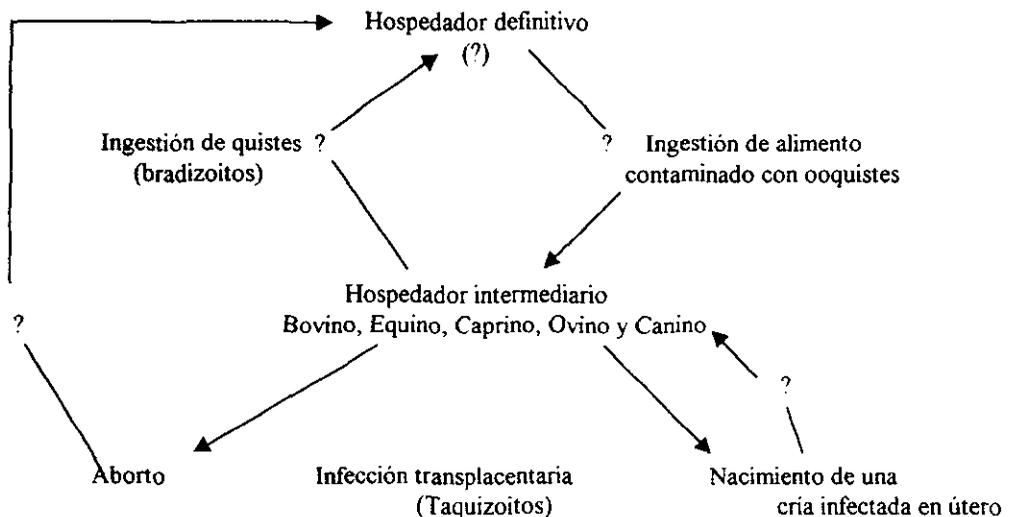
* El diagnóstico se obtuvo a través de serología (ELISA).

FUENTE: Dubey JP, Lindsay DS. Vet Parasitol 1996;67:1-59.

El ciclo de vida y las fuentes de infección se desconocen, los quistes con múltiples bradizoitos en Sistema Nervioso Central (SNC) y grupos de taquizoitos en tejido muscular y hepático entre otros, son las únicas fases del ciclo que se han detectado. El único modo de transmisión natural identificado es la vía congénita. La infección transplacentaria puede ocurrir repetidamente en el mismo animal. También se ha señalado una reactivación y transmisión durante la preñez. Los taquizoitos penetran a las células del hospedador por invasión activa pudiendo afectar neuronas, hepatocitos, miocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales tubulares del riñón. Con respecto a su ultraestructura, los taquizoitos de *Neospora caninum* tiene una membrana citoplasmática con 3 capas, 22 microtúbulos, 2 anillos apicales, 1 conoide, 1 anillo polar, de 1 a 3 mitocondrias, hasta 150 micronemas, de 8 a 18 rhoptrias, un aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y liso un núcleo y un nucleolo.^{12,15,22}

Los quistes con bradizoitos sólo se encuentran en el SNC y son de redondos a ovales, llegando a mediar hasta 107 micras. La pared del quiste es lisa y mide hasta 4 micras de espesor dependiendo del tiempo de infección. La pared del quiste contiene estructuras parecidas a túbulos, no hay septos y no existe pared quística secundaria. Los bradizoitos son delgados de 6 a 8 por 1 a 1.8 micrómetros y contienen los mismos organelos que se encuentran en los taquizoitos con excepción de que existen menos rhoptrias. El núcleo es terminal o subterminal y los micronemas se arreglan con frecuencia en forma perpendicular con respecto al citoplasma. Entre los bradizoitos existen estructuras tubulares vesiculares.¹⁵

ESQUEMA HIPOTÉTICO DEL CICLO DE TRANSMISIÓN DE *Neospora caninum*



El aborto es el único hallazgo clínico en las vacas infectadas y normalmente se presenta entre el cuarto y sexto mes de gestación, en donde se ha podido observar que estas vacas por lo general no sufren de retención de placentas. Puede haber reabsorción embrionaria, los fetos pueden morir dentro del útero, puede haber autólisis fetal o momias. Pueden nacer muertos, con problemas neurológicos o clínicamente normales pero crónicamente infectados.^{13,17}

No existen lesiones macroscópicas ni en fetos ni en las placentas. Las lesiones microscópicas son las más significativas en los fetos abortados presentándose principalmente lesiones en cerebro, médula espinal, miocardio e hígado y ocasionalmente en pulmón y riñones. Estas consisten en necrosis y gliosis multifocal, encefalitis no supurativa, miositis y hepatitis no supurativa. En las becerras afectadas, las lesiones en SNC consisten en focos centrales de necrosis rodeados de células inflamatorias mononucleares y células de la Glia.^{15,17}

Pocos taquizoitos han sido identificados en estas lesiones, ya que son difíciles de encontrar por lo que se ha utilizado la inmunohistoquímica que facilita su identificación. En los cortes histológicos es posible observar quistes con numerosos bradizoitos únicamente en SNC o grupos de taquizoitos intracelulares o libres en otros tejidos, principalmente el muscular. Estas lesiones y estructuras similares se pueden observar también en casos de infección por *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis* sp. por lo que se aconseja realizar pruebas de inmunohistoquímica para demostrar antígenos específicos de *Neospora caninum*. Cabe señalar que en casos de Toxoplasmosis se pueden encontrar abundantes quistes con bradizoitos en SNC y en otros órganos como hígado, riñón, pulmón o tejido muscular, mientras que en casos de neosporosis los quistes con bradizoitos son escasos, de pared más gruesa y sólo se encuentran en SNC.^{12,17}

La histopatología es un método diagnóstico muy útil ya que las lesiones microscópicas en los fetos son muy características y altamente compatibles con la infección del parásito, no obstante si se tiene la fortuna de encontrar quistes parasitarios en SNC, el diagnóstico resulta más satisfactorio.¹⁵

Además de la histopatología se han utilizado otras pruebas diagnósticas específicas para la detección de la enfermedad tanto en vacas como en fetos abortados.

La inmunohistoquímica utilizando la técnica de inmunoperoxidasa con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (CAB) y anticuerpos anti-*Neospora caninum*, permite identificar antígenos específicos del parásito. Este es un método de diagnóstico muy confiable que se practica en los tejidos fetales incluidos en parafina para identificar antígenos específicos del parásito permitiendo diferenciarlo de otros con estructuras semejantes.^{12,15}

La prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFA) ha sido recientemente modificada utilizando suero bovino para detectar taquizoitos de *Neospora caninum* en vacas. También es efectivo para demostrar altos niveles de anticuerpos anti-*Neospora caninum* en suero de becerros afectados en forma congénita a través de la placenta. Esta técnica se puede utilizar en la investigación epidemiológica.^{16,17}

Morales, menciona que recientemente Cole y col. han desarrollado la técnica de anticuerpos monoclonales para la detección de *Neospora caninum* en fetos abortados. Un anticuerpo murino monoclonal (MAB) 6G7 dirigido a los taquizoitos del parásito es capaz de reconocer 8 antígenos mayores y algunos antígenos menores, lo cual se puede observar a través del análisis de Western Blot. ¹⁶

Los cultivos celulares y la inoculación en ratones se pueden utilizar para aislar a éste protozoario de tejidos fetales, aún que se informan escasos aislamientos en la literatura mundial. El éxito del posible aislamiento depende del número de microorganismos presentes y el estado de autólisis de los tejidos. ¹⁵

La técnica de ELISA indirecta recientemente se ha utilizado para el diagnóstico de la Neosporosis bovina mediante la detección de anticuerpos en sueros de vacas sospechosas. Esta técnica ha demostrado ser altamente sensible y específica por lo que puede ser utilizada para determinar la seroprevalencia de los hatos. ¹⁶

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de diagnóstico de reciente utilización en países como Estados Unidos y Suecia. ¹⁵

Hasta el momento no hay pruebas ni ensayos del tratamiento contra la infección de *Neospora caninum* en vacas o becerros. Sin embargo estudios en cultivos celulares indican que una variedad de productos tales como lasolacid, monensina, piritrexim, pirimetamina y trimetoprim actúan eficazmente en contra de los taquizoitos. ¹⁷

Estudios experimentales en ratones indican que la sulfadiazina de sodio (4 mg/kg./día diluidos en agua para beber) es efectiva en el tratamiento de la neosporosis si se administra antes de que aparezcan los primeros signos clínicos, pero es menos efectivo si se administra después de aparecer los signos clínicos. ¹⁷

En perros infectados con *Neospora caninum* se ha utilizado la combinación de sulfas-trimetoprim más pirimetamina, esta combinación se aplica antes de aparecer los primeros signos clínicos. ¹⁷

Debido a que se desconoce el ciclo de vida del parásito, ha sido difícil el desarrollo de programas de control de la neosporosis en vacas. Los ganaderos y médicos veterinarios deben de estar consientes de que en vacas se da la transmisión repetida en la progenie y que además los becerros nacidos de estas vacas pueden nacer débiles, paralizados o portadores asintomáticos. ¹⁷

Es posible que los ooquistes se encuentren en las heces de un probable hospedador definitivo no identificado que se convierte en la fuente de infección para el bovino. El alimento y el agua deberá protegerse de la contaminación de las heces de los animales que pudieran actuar como transmisores y deberán de remover todos los tejidos potencialmente infectados, tales como abortos y placentas del ambiente que puedan servir como una fuente de infección para huéspedes susceptibles. Así también se deberá limitar el acceso al hato de cualquier animal enfermo para evitar que contamine el alimento y el agua y que pudiera ser una fuente de transmisión de la enfermedad. ^{17,18}

En lo que respecta a México, ya se han podido detectar lesiones fetales características en tejido muscular y hepático, quistes parasitarios y taquizoitos en SNC de fetos abortados, lo cual ha sido confirmado a través de la inmunohistoquímica; así como seropositividad utilizando la técnica de ELISA en diversos hatos del Altiplano Mexicano.¹⁵

En otro estudio anatomopatológico para investigar las causas de aborto en fetos de bovinos provenientes del CAITSA, en el periodo de un año, se encontró que de 55 fetos suministrados para diagnóstico, 20 (36.36%) presentaban lesiones compatibles con neosporosis.²¹

Actualmente Morales y col. realizan una investigación epidemiológica con respecto a la distribución y el impacto de la neosporosis bovina en el Altiplano Mexicano utilizando para ello la histopatología e inmunohistoquímica de los fetos, así como la detección de anticuerpos anti *Neospora caninum* en hatos lecheros a través de la técnica de ELISA.¹⁵

Los resultados parciales a la fecha en el periodo de estudio de dos años se resumen en los cuadros 7 Y 8.

CUADRO 7 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO HASTA AGOSTO DE 1997

Procedencia	No. de fetos estudiados	No. de fetos compatibles con Neosporosis	%
Tizayuca, Hgo. *	89	33	37.07
Torreón, Coah. *	56	29	51.78
Querétaro, Qro.	18	1	5.55
Irapuato, Gto.	5	1	20.0
Chalco, Edo. Mex. *	4	1	25
Aguascalientes, Ags. *	6	2	33.33
Guadalajara, Jal.	2	0	0
Reynosa, Tamps.	1	0	0
Tlaxcala, Tlax.	1	1	100
TOTAL	182	68	37.36

* Lugares en donde se han identificado quistes parasitarios.

FUENTE: Morales SE. Memorias del CONASA 1997.

CUADRO 8 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO POR ELISA HASTA AGOSTO DE 1997

Procedencia	Sueros estudiados	Sueros positivos	%
Tizayuca, Hgo.	47	20	42.6
Chalco, Edo. Mex.	62	22	35.4
Torreón, Coah.	57	40	70.17
Querétaro, Qro.	23	17	73.9
Aguascalientes, Ags.	19	14	73.9
Irapuato, Gto.	5	4	80.0
TOTAL	213	117	54.92

FUENTE: Morales SE. Memorias del CONASA 1997.

Para haber llegado al diagnóstico de la neosporosis bovina, la investigación se apoyó en el laboratorio clínico, el cual se considera como una herramienta para el buen desempeño del ejercicio clínico del Médico Veterinario Zootecnista y la información que se obtiene a partir de las diferentes pruebas, ayuda a emitir un diagnóstico y a establecer el tratamiento adecuado a la brevedad posible en beneficio de la salud de los animales.²³

Para lograr esto se requiere de una relación estrecha entre el veterinario clínico y el laboratorio de diagnóstico, y desde luego la toma y envío adecuado de las muestras para que estas lleguen en condiciones óptimas al laboratorio de diagnóstico.²³

Las principales muestras que brindan información pronta y confiable en bovinos son la sangre, la orina y además el líquido ruminal.²³

La sangre está constituida por un medio líquido en el que están suspendidos los elementos celulares procedentes de los tejidos hematopoyéticos, que circulan por todo el cuerpo a través de todo el sistema vascular sanguíneo, todo ello impulsado por el corazón.²⁴

Las células de la sangre se forman en los órganos hematopoyéticos que comprenden la médula ósea, el hígado, el bazo, los nodulos linfáticos y el sistema mononuclear fagocitario. Estos tejidos producen gran cantidad de elementos celulares, y en la circulación de la sangre los pone directa o indirectamente en íntima unión con la inmensa mayoría de las células del cuerpo.^{24,25}

Las principales funciones de la sangre son aportar a las células tisulares oxígeno, nutrientes esenciales, enzimas, hormonas, agua, electrolitos y sistemas de amortiguamiento, así como retirar los productos metabólicos de desecho como primer paso para su eliminación del cuerpo. Además, determinadas células sanguíneas conforman un mecanismo de defensa contra la invasión corporal de agentes vivos patógenos. Una protección aún más significativa contra tales acciones la proporcionan las inmunoglobulinas (Ig) presentes en la circulación sanguínea.²⁴

El mecanismo que mantiene el equilibrio de los valores normales de la sangre es muy delicado, y cuando en el cuerpo surge la enfermedad es probable que se produzcan cambios en la composición de la sangre de la suficiente magnitud para que provoquen la aparición de signos clínicos, o alternativamente, que sean reconocidas mediante adecuadas técnicas de laboratorio.²⁴

En el cuadro 9 se indican los valores de referencia del hemograma en los bovinos adultos.

CUADRO 9 VALORES DE REFERENCIA DEL HEMOGRAMA EN LOS BOVINOS ADULTOS

PARAMETRO	VALORES
Hamatócrito	0.24 - 0.46 L/L
Eritrocitos	5.0 - 10.0 x 10 ¹² /L
Hemoglobina	80 - 150 g/L
Proteínas Plasmáticas	60 - 80 g/L
Indices Eritrocitarios:	
VGM	40 - 60 ft
HGM	11 - 17 pg
CMHG	300 - 360 g/L
Leucocitos	4.0 - 12.0 x 10 ⁹ /L
Linfocitos	2.5 - 7.5 x 10 ⁹ /L
Neutrófilos Segmentados	0.6 - 4.0 x 10 ⁹ /L
Neutrófilos en Banda	0.0 - 0.1 x 10 ⁹ /L
Eosinófilos	0.0 - 2.4 x 10 ⁹ /L
Basófilos	0.0 - 0.2 x 10 ⁹ /L
Monocitos	0.0 - 0.8 x 10 ⁹ /L
Fibrinógeno	2.0 - 8.0 x 10 ⁹ /L

(24,26,27,28,29,30)

La importancia de este trabajo radica en realizar hemogramas en vacas seropositivas a *Neospora caninum*, ya que hasta el momento no se han dado a conocer estudios que proporcionen esta información y que nos permita obtener datos específicos para poder conocer las posibles alteraciones sanguíneas provocadas por la parasitosis.

Es posible que en los animales portadores de Neosporosis, los valores del hemograma se vean alterados, debido a la multiplicación activa de los taquizoitos, por lo que se proponen los siguientes objetivos e hipótesis.

OBJETIVO ACADÉMICO

Aplicar en la práctica profesional los conocimientos adquiridos de las materias del plan de estudios de la carrera de Médico Veterinario Zootecnista tales como: Anatomía, Fisiología, Zootecnia de Bovinos Productores de Leche, Enfermedades Infecciosas, Farmacología, Patología, Laboratorio Clínico, Clínica Bovina, Técnicas Quirúrgicas y Terapéutica Quirúrgica.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los valores del hemograma en vacas serológicamente positivas a *Neospora caninum* en la Cuenca Lechera de Tizayuca Hidalgo, y compáralos con valores de vacas clínicamente sanas utilizadas como grupo control.

OBJETIVO SOCIAL

Apoyar al médico veterinario de campo a la realización del trabajo clínico y con ello beneficiar directamente al productor de ganado lechero, aumentando la eficiencia reproductiva en su establo, para obtener una mayor cantidad de leche para la alimentación, ya que México es deficiente en este rubro y ha sido necesaria la importación de leche en polvo, donde la SAGAR menciona una capacidad de 126,691 toneladas (1996).

HIPÓTESIS

Existen diferencias significativas entre los valores hematológicos de las vacas seropositivas a Neosporosis y vacas clínicamente sanas.

DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

El servicio social – titulación se realizó en el CAITSA, con el Grupo Impulsor Pecuario Especialista en Bovinos (GIPEB,SC) en el área de clínica, en un periodo de 6 meses que comprendió del 15 de Octubre de 1997 al 15 de Abril de 1998, bajo la asesoría de un Médico Veterinario Zootecnista, el cual tiene a su cargo una ruta de 10 establos que se realizaron diariamente de Lunes a Viernes y guardias de fin de semana (Sábado y Domingo).

El trabajo a realizar consistió en visitar a cada uno de los establos para resolver problemas clínicos en las vacas; entre los cuales los más comunes fueron: Enfermedades Respiratorias, Digestivas, Reproductivas, Mastitis y Pododermatitis.

Para poder determinar el tipo de problema el cual se estaba enfrentando fue necesario llevar a cabo un método de inspección del animal enfermo; que se realizó de la siguiente forma: se estructuró una breve anamnesis, interrogando al encargado del establo, mientras que se realizaba una exploración general del paciente tomando en cuenta aspectos como: actitud, aspecto del animal, estado nutricional, comportamiento y constantes fisiológicas (Frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, movimientos ruminales y temperatura).

Una vez echa la exploración general se determinó el problema del animal enfermo, posteriormente se realizó una exploración especial, ya sea del Sistema tegumentario, cardiovascular, respiratorio, digestivo, reproductor, nervioso, locomotor o bien ojo y oído.

Cuando aún con todo este procedimiento no fue suficiente, se tomaron muestras tales como: sangre, heces, contenido ruminal, entre otros, que fueron enviados al Laboratorio de Diagnóstico y Patología del CAITSA, donde se corrieron pruebas de Hemograma, Tinción de Ziehl-Nielsen, exámenes coproparasitoscópicos y aislamientos bacterianos.

A partir de toda esta información fue más sencillo emitir un diagnóstico y de esta forma aplicar el tratamiento más adecuado; ya sea de manejo, alimentación, médico o bien quirúrgico; dando seguimiento hasta la alta o baja del paciente.

A cada uno de los animales enfermos se les levantó una hoja clínica y toda esta información fue recabada y analizada, para determinar la incidencia y prevalencia de cada una de las enfermedades; para que de esta manera se apliquen medidas preventivas.

CUADRO METODOLÓGICO

El presente trabajo se llevó a cabo en el CAITSA, el cual está situado sobre el kilómetro 51.5 de la carretera libre México - Pachuca, a medio kilómetro de distancia del pueblo de Tizayuca, Hidalgo; teniendo como límites: A lo largo, el kilómetro 57 de la carretera federal No. 85 (límite Norte) del área urbana de la ciudad de México y el kilómetro 130 de la misma carretera federal (límite Noreste) del Distrito de riego 03 de Mixquiahuala, Hidalgo.⁴ A lo ancho, pequeños cerros y montañas ubicadas en ambos lados de la carretera federal No. 85 y el Distrito 03. Sus coordenadas son de 19°51'25" de latitud Norte y 98°59'8" de longitud Oeste de Greenwich, además su altitud es de 2710 MSNM. Tiene un clima BS1 Kw (según Köeppen, tipo semiseco, templado y lluvias en Verano), una precipitación pluvial anual de 624.9 mm y una temperatura anual promedio de 16.3 °C.^{2,4}

Se realizaron actividades con el Grupo Impulsor Pecuario Especialista en Bovinos (GIPEB,SC), en el área de clínica, para la resolución de problemas rutinarios en las vacas, en los que destaca la incidencia de abortos. Actualmente en el CAITSA, muchos de estos abortos se atribuyen a la neosporosis bovina, es por esta razón que nació la inquietud de hacer una investigación y una evaluación clínica de esta enfermedad, basándose en la determinación de los valores hematológicos de vacas seropositivas a neosporosis.

1. Se seleccionaron dos grupos de vacas que pertenecen a los establos del CAITSA. El primer grupo se formó de 30 vacas que demostraron tener elevado número de anticuerpos anti-*Neospora caninum* (seropositivas) y el segundo grupo fue formado por 10 vacas seronegativas (grupo control). La seropositividad y seronegatividad se demostraron a través de la técnica de ELISA, realizada anteriormente en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
2. A cada grupo de vacas, se realizó un examen clínico general.
3. Se obtuvieron las muestras sanguíneas de las 40 vacas.
4. Para la realización del hemograma, se utilizaron tubos con anticoagulante (EDTA) y agujas. La sangre fue obtenida de la vena coccigea de las vacas.
5. Una vez obtenida la muestra fue transportada en refrigeración hacia la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en donde se realizaron los 40 hemogramas utilizando el siguiente método:

En el hemograma se hicieron las siguientes determinaciones: hematócrito, hemoglobina, conteo de glóbulos rojos y glóbulos blancos, proteínas plasmáticas, fibrinógeno y frotis sanguíneo (conteo diferencial leucocitario).^{26,31,32}

Determinación de Hemoglobina

- 1.- Se colocó en un tubo de ensaye 5 ml de reactivo de Drabkin.
- 2.- Se agregó 0.02 ml de sangre.
- 3.- Se mezcló perfectamente y se dejó reposar 10 minutos.
- 4.- Se realizó la lectura contra blanco de reactivo en espectrofotómetro a 540 nm.
- 5.- Se interpoló en la curva la lectura de D.O. del problema.

Hematócrito

- 1.- Se llenó con sangre un tubo capilar, y se selló un extremo a fuego directo.
- 2.- Se centrifugó a 11,000 rpm durante 5 minutos.
- 3.- El hematócrito se midió en un lector para hematócrito.

Proteínas Plasmáticas y fibrinógeno

- 1.- Ambos se midieron en un refractometro clínico.
- 2.- El fibrinógeno se midió mediante la técnica de desnaturalización a 56 °C por tres minutos.

Para la obtención de los Índices Eritrocitarios, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Volumen Globular Medio} = \frac{(\text{Hematócrito } L/L) (1000)}{\text{Eritrocitos } \times 10^{12} /L} = \text{ft}$$

$$\text{Hemoglobina Globular Media} = \frac{\text{Hemoglobina } g/L}{\text{Eritrocitos } \times 10^{12} /L} = \text{pg}$$

$$\text{Concentración Media de Hemoglobina Globular} = \frac{\text{Hemoglobina g/L}}{\text{Hematócrito L/L}} = \text{g/L}$$

Conteo de Glóbulos rojos:

1. Como diluyente se empleo el reactivo de Hayem, en una dilución de 1:200, utilizando una pipeta de Thoma para Glóbulos Rojos.
2. Se realizó el conteo en el hemocitómetro o cámara de Neubauer.

Conteo de Glóbulos Blancos:

1. Como diluyente se empleo el reactivo de Türk, en una dilución 1:20, utilizando una pipeta de Thoma para Glóbulos Blancos.
2. Se realizó el conteo en el hemocitómetro.

Conteo Diferencial Leucocitario:

1. Se realizó observando los frotis sanguíneos teñidos con colorante de Wright; utilizando un contador de células de 8 teclas. Además se observó la morfología celular.

Una vez que se obtuvieron los resultados de los 30 hemogramas de vacas serológicamente positivas a anticuerpos anti-*Neospora caninum*; y de las 10 vacas tomadas como grupo control, se realizó un análisis estadístico y una comparación entre los valores de ambos grupos. Así como una comparación contra valores de referencia.

Para el análisis estadístico se capturaron los resultados de los hemogramas en un programa de computación (EXCEL); en donde se obtuvo la media y desviación estandar de cada uno de los parámetros.

RESULTADOS, EVALUACIÓN Y/O ANÁLISIS

Los resultados del presente estudio se resumen en el cuadro 10, en donde se realizó una comparación entre las 30 vacas serológicamente positivas a los anticuerpos anti - *Neospora caninum* y las 10 vacas negativas utilizadas como grupo control.

CUADRO: 10 VALORES HEMATOLÓGICOS DE VACAS SEROPOSITIVAS A ANTICUERPOS ANTI - *Neospora caninum* Y VACAS CONTROL.

PARA METRO	UNIDAD	POSITIVAS (n = 30)	NEGATIVAS (n = 10)
Hematócrito	L/L	0.31 ± 0.062	0.33 ± 0.1
Eritrocitos	x 10 ¹² /L	6.9 ± 0.27	7.6 ± 0.46
Hemoglobina	g/L	113 ± 0.21	113 ± 0.37
Proteínas Plasmáticas	g/L	95 ± 1.53	78 ± 2.65
VGM	ft	47.1 ± 1.63	46.2 ± 2.82
HGM	pg	16.7 ± 0.54	15.7 ± 0.95
CMHG	g/L	350 ± 0.43	340 ± 0.74
Leucocitos	x 10 ⁹ /L	11.1 ± 3.07	8.0 ± 1.73
Linfocitos	x 10 ⁹ /L	6.7 ± 2.43	5.07 ± 1.51
N. Segmentados	x 10 ⁹ /L	3.6 ± 1.30	2.2 ± 1.23
N. Bands	x 10 ⁹ /L	0 **	0 **
Eosinófilos	x 10 ⁹ /L	0.3 ± 0.28	0.4 ± 0.31
Basófilos	x 10 ⁹ /L	0 **	0 **
Monocitos	x 10 ⁹ /L	0.3 ± 0.38	0.4 ± 0.31
Fibrinogeno	x 10 ⁹ /L	3 ± 0.03	3 ± 0.06

** No se encontraron células en los 40 frotis sanguíneos estudiados.

Este cuadro indica que ambos grupos son similares y lo más importante es que los valores obtenidos se encontraron dentro de lo que la literatura considera normal; sólo en el caso de la Proteínas plasmáticas notamos una ligera diferencia entre los dos grupos; esto posiblemente por la presencia del anticuerpo (*Neospora caninum*).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados se puede concluir que en los valores de los 30 hemogramas estudiados en vacas serológicamente positivas a anticuerpos anti-*Neospora caninum*; no se encontraron alteraciones significativas, salvo en proteínas plasmáticas, en donde se observo un ligero aumento ($P < 0.05$). Por su parte el grupo control se mantuvo dentro de los valores que la literatura considera normal.

Aparentemente *Neospora caninum*, no repercute en la fisiología de la sangre, lo que podría indicar que los taquizoitos no se multiplican en las células rojas y/o las dañan. Además por otro lado no son suficientemente reconocidos por el organismo como para que éste responda con una leucocitosis. Quizá se requiera de mecanismos inmunodepresores hasta la fecha desconocidos que predispongan a la multiplicación activa de los taquizoitos y al aborto.

Otro punto importante a considerar, es que los resultados indican que el hemograma no es un método diagnóstico para la neosporosis bovina; por esta razón el diagnóstico se deberá encaminar hacia otras pruebas ya antes mencionadas, aunque será conveniente continuar con estudios de hemogramas para analizar más detalladamente las proteínas plasmáticas.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Quizá la parte más importante de esta enfermedad y en donde se debe hacer más énfasis, es en la prevención de la neosporosis bovina; por lo tanto las recomendaciones y sugerencias van encaminadas sobre este punto.

Uno de los aspectos que trae consecuencias graves en toda explotación bovina, es la presencia de otras especies animales como: ganado ovino y caprino, perros, gatos, roedores y aves; por lo que es conveniente la erradicación de estos animales en la explotación; además, específicamente en la neosporosis bovina, se sospecha que existe un hospedador definitivo en el ciclo biológico del parásito, por lo tanto no debemos descartar la posibilidad que alguna de estas especies, sea el responsable de intervenir en el ciclo de vida del protozooario.

Un aspecto más y de suma importancia de tomar en cuenta, es la entrada y salida del establo en forma incontrolada de personal y vehículos ajenos a la explotación; así que será conveniente que se lleve a cabo una vigilancia más estricta de todo lo que entra y sale del establo, sobre todo con las personas que llegan a comprar las vacas y becerros de desecho, vendedores de forrajes y concentrados, incluyendo a los carros que entran a colectar la leche del establo, etc.

Cada uno de los establos deberá contar con un tapete sanitario con desinfectante en la entrada, también deberá mantener limpias y en buenas condiciones todas sus instalaciones como corrales, camas, comederos, bebederos, parideros, becerrerías, sala de ordeña, utensilios de limpieza y medios de transporte. Además los forrajes y concentrados deberán ser de alta calidad y que se encuentren en estado óptimo para su consumo.

Una sugerencia más es que todas las vacas de importación deberán de contar con un certificado, que nos indique que son libres de neosporosis bovina. Así también a todas las vacas se les tendrá que correr la prueba de ELISA para detectar anticuerpos anti-*Neospora caninum* para poder determinar la incidencia y prevalencia real de esta enfermedad.

Por último, si todos contribuyeran con todas estas recomendaciones y sugerencias, se estará seguro, que la neosporosis bovina y muchas enfermedades más, serán controladas en un alto porcentaje, para el bienestar de los animales y del propio ganadero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boletín mensual de leche. SAGAR Julio 1998; VI (7).
2. García AJG. Evaluación de un programa reproductivo en base a la aplicación de un análogo sintético de la Prostaglandina F₂ alfa (CLOPROSTENOL) en vacas Holstein durante el post-parto en la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo (Informe de Servicio Social-Titulación de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM, 1997.
3. Información económica pecuaria . Confederación Nacional Ganadera. No. 7 Diciembre 1998.
4. Cruz ZO. Incidencia de abortos y comparación de parámetros reproductivos en vacas abortadas y no abortadas, en la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo, en el año de 1995 (Informe de Servicio Social Titulación de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM, 1997.
5. Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5ª ed. USA: McGraw-Hill, 1989.
6. Blood DC, Radostits OM, Arundel JH, Gay CC. Medicina veterinaria. 7ª de. McGraw-Hill, 1993.
7. Zarco L. Abortos en reproducción en animales domésticos. Limusa, 1990.
8. Xolalpa VM, Jaramillo, Pesado CJ. Evaluación financiera de un programa de control de Brucelosis bovina en la Comarca Lagunera (1987 - 1990). Vet Mex 1993, 24 (2): 127 - 134.
9. Gerencia de Asistencia Técnica LALA. El problema de los abortos en la Comarca Lagunera de México. Hoard's Dairyman 11, 1995: 1034 - 1035.
10. De la Cruz NRH. Frecuencia de interrupciones en la gestación de vacas Holstein - Friesian, durante el año de 1988, en la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM, 1995.
11. Dubey JP. Neosporosis. Agri-Practice 1994; 15: 16 - 17.
12. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol 1996, 67: 1 - 59.

13. Dubey JP, Lindsay DS. Neosporosis – A newly recognized protozoan disease. *J Vet Parasitol* 1996; 10 (2): 99 – 145.
14. *Neospora caninum* Infection in cattle. Field disease investigation unit, Washington State University, Collage of Veterinary Medicine. <http://www.cahe.w.edu/~academic/as/emt.html> 22 – Oct. – 97.
15. Morales SE. Situación de la neosporosis en México. Memorias del CONASA 1997.
16. Morales SE, Puente CE, Santa Cruz M, Trigo TF. Neosporosis bovina y su diagnóstico. *México Ganadero* 1997; 427: 14 – 15.
17. Lindsay DS, Dubey JP, Cole RA. *Neospora* – Induced protozoal abortions in cattle. *Comp Cont De Pract Vet* 1993; 15 (6): 882 – 889.
18. Medina ES. Neosporosis, una causa de aborto en ganado lechero. *México Holstein* 1996; 27: 30 – 31, 6 – 7.
19. Paré J. Mise à jour sur les infections a *Neospora* sp. chez les bovins. *Méd Vét Québec* 1995; 25 (1): 12 – 15.
20. Lally NC, Jenkins MC, Dubey JP. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an ELISA for the diagnosis of bovine neosporosis. <http://www.nal.usda.gov/tektran/data/000006/80/000006809.html> 22 – Oct. – 97.
21. Morales SE, Ramírez LJ, Trigo TF, Ibarra VF, Puente CE, Santa Cruz M. Descripción de un caso de aborto bovino asociado a infección por *Neospora* sp. en México. *Vet Mex* 1997; 28 (4): 353 – 357.
22. Quiroz RH. Neosporosis bovina. *Acontecer Bovino* 1996; 1 (6): 11 – 15.
23. Quiroz RGF. Cómo enviar muestras de bovinos para análisis clínicos. *México Ganadero* 1997; 421: 37 – 40.
24. Kelly WR. Diagnóstico clínico veterinario. 1ª ed. México: Continental, 1988.
25. Tizard I. Inmunología veterinaria. 4ª ed. USA: McGraw-Hill, 1995.
26. Benjamin MM. Manual de patología clínica veterinaria. Limusa, 1991.

-
27. Duncan JR. Veterinary laboratory medicine. 2ª ed. Iowa state university press, 1994.
28. Kaneko JJ. Clinical biochemistry of domestic animals. 3ª ed. Florida USA: Academic press, 1989.
29. Schalm OW, Jain NC, Carroll EJ. Hematología veterinaria. 1ª ed. Buenos Aires Argentina: Hemisferio Sur. 1981.
30. Jain NC. Essentials of veterinary hematology. 1ª ed. Philadelphia USA: Lea & Febiger, 1993.
31. Coles EH. Veterinary clinical pathology. 4ª ed. Philadelphia USA: Saunders Company, 1986.
32. Valadez PJC, Contreras FME, Del Castillo RAR. Manual de prácticas de laboratorio veterinario. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM, 1995.