

ASOCIACIÓN DE QUISTES FOLICULARES OVÁRICOS CON LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS Y AGENTES CAUSANTES DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES INFECCIOSAS REPRODUCTIVAS EN VACAS
OVARIAN FOLLICULAR CYSTS ASSOCIATED WITH THE PRESENCE OF ANTIBODIES AND MAIN AGENTS CAUSING REPRODUCTIVE INFECTIOUS DISEASES IN COWS

Cedillo Sánchez Lizsully Concepción¹, Banda Ruiz Víctor Manuel¹, ¹Morales Salinas Elizabeth², Villagómez Amezcua Eugenio¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Palo-Alto);

²Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

Un proceso que afecta directamente la fertilidad de las vacas lecheras, es la presencia de quistes foliculares ováricos (QF) causados por factores hormonales. En la actualidad no existen informes que indiquen una relación entre la presencia de estos quistes y agentes infecciosos, por lo que el objetivo principal del presente estudio fue Identificar la asociación de QF con la presencia de anticuerpos y antígenos de enfermedades reproductivas tales como leptospirosis, brucelosis, neosporosis, diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina en bovinos productores de leche. Se seleccionaron 116 bovinos hembras de raza Holstein en edad reproductiva y se formaron 4 grupos de animales. El grupo 1 se conformo por 35 vacas de una unidad de producción lechera clínicamente sanas (UPS) con más de dos partos. El grupo 2 fue conformado por 28 vacas de una unidad de producción lechera con quistes foliculares (QF) (> a 2 cm de diámetro) (UPOQ). El grupo 3 se conformó por 30 vacas utilizadas como testigos que fueron enviadas al rastro sin la presencia de QF (ROS) y el grupo 4 fue constituido por 23 vacas enviadas al rastro a las cuales se les detectaron (QF) (ROQ). Las muestras de suero y líquido folicular (LF) de las vacas de cada grupo se sometieron a la detección de anticuerpos a través de técnicas serológicas recomendadas para cada enfermedad. Para la detección de material genético de los agentes involucrados en cada enfermedad, se aplicaron diferentes protocolos de PCR a partir de muestras de LF de los animales con y sin quistes. Adicionalmente con el fin de corroborar la presencia

¹Elizabeth Morales Salinas. Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria. Avenida Universidad 3000, México, D.F. C.P. 04510. morales@unam.mx

Recibido: 11/09/2011 Aceptado: 25/12/2011

de QF y descartar otro tipo de quistes ováricos, los ovarios quísticos fueron procesados por la técnica histológica de rutina. Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva. Para determinar si la presencia de anticuerpos en suero y LF de los animales sujetos a estudio difería con la presencia de los microorganismos detectados de acuerdo al grupo de animales, se emplearon pruebas no paramétricas (Suma de posiciones de Wilcoxon/U Mann-Whitney) con un grado de significancia de 0.05. Estadísticamente se determinó que no existen diferencias entre los grupos de animales analizados para cada una de las enfermedades ($p > 0.05$) con respecto a la presencia de anticuerpos en suero (AcS), sin embargo, si se encontró diferencia estadística del grupo 3 (ROS) con el resto de los grupos con respecto a la presencia de anticuerpos en líquido folicular (AcLF) para *L. interrogans* ($p= 0.002$) y *Brucella* sp. ($p= 0.006$). Además en los cuatro grupos de animales se determinó estadísticamente que existe diferencia entre los animales que presentan AcS con respecto a los que presentan AcLF para *Brucella* sp. ($p= 0.003$) y el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) ($p= 0.000$), mientras que para *L. interrogans*, *Neospora caninum* y el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (VRIB) no se encontró diferencia estadística ($p>0.05$). En relación con los animales que presentaron AcS y la manifestación de un QF, estadísticamente se encontró que son independientes para las diversas enfermedades ($p>0.05$). Mientras que para los animales que presentan AcLF y la manifestación de un quiste, se halló una posible relación de estos elementos para *L. interrogans* ($p= 0.000^*$) y *Brucella* sp. ($p= 0.004^{**}$). Sin embargo, la presencia de AcLF para *Neospora caninum*, el VDVB y el VRIB no se encontraron relacionados con la presencia de quistes ($p>0.05$). Con respecto a los resultados de PCR, solamente se hallaron 4 muestras positivas para *Brucella* sp. y 14 muestras positivas para el VRIB. De acuerdo a los resultados del presente estudio, se concluye que *Brucella* sp., *Leptospira interrogans*, *Neospora caninum*, el VDVB y el VRIB, no se encuentran relacionadas directamente con la generación de quistes foliculares.

Palabras clave: Quistes foliculares, vacas, enfermedades infecciosas.

ABSTRACT

One of the process that directly affects the fertility of milk cows, is the presence of ovarian follicular cysts (FC) caused by hormonal factors. Nowadays do not exist reports that indicate some relation between the presence of these cysts and infectious agents, therefore the main objective of this study was to identify the association of FC with the presence of antibodies and antigens of reproductive diseases such as leptospirosis, brucellosis, neosporosis, bovine viral diarrhea, and infectious bovine rhinotracheitis in milk cows. One hundred and sixteen Holstein milk cows were selected and 4 groups of animals were formed. The group 1 was formed by 35 cows from milk production unit clinically healthy (UPH) and with more than two births each. The group 2 was formed by

28 cows from a milk production unit with ovarian follicular cysts (>to 2 cm of diameter) (UPFC). The group 3 was formed by 30 controls cows that were sent to slaughter without FC (SOH) and the group 4 was formed by 23 cows that were sent to slaughter with FC (SOC). The serum samples and follicular liquid (FL) of the cows of each group were analyzed for antibodies detection through recommended serologic techniques for each disease. For the detection of genetic material of the agents involved in each disease, different PCR protocols from FL samples of the animals with and without FC were applied. Additionally with the purpose of to corroborate the FC presence and to discard another type of ovarian cysts, the ovaries with cysts were processed by the histological routine technique. The results were analyzed by means of descriptive statistic. In order to determine if the presence of serum and LF antibodies of the animals differed with the presence of the microorganisms detected according to the animal group, nonparametric tests (Extreme of positions of Wilcoxon/U Mann-Whitney) with a degree of significance of 0.05 were used. Statistically was determined that there was no difference between the animal groups analyzed for each disease $p > 0.05$ with respect to the presence of serum antibodies (AbS), ($p > 0.05$). Nevertheless, there was statistical difference of group 3 (SOH) with the rest of the groups respect to the presence of antibodies in follicular liquid (AbFL) for *L. interrogans* ($p = 0,002$) and *Brucella* sp. ($p = 0,006$). In addition in the four animal groups, it was determined statistically that there was difference between the animals with AbS respect to those with AbFL for *Brucella* sp. ($p = 0,003$) and the bovine viral diarrhea virus (BVDV) ($p = 0,000$), whereas for *L. interrogans*, *Neospora caninum* and the Infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) there was no statistical difference ($p > 0.05$). In relation to animals that presented AbS and FC, statistically was found that they are independent for different diseases ($p > 0.05$). Whereas for animals that present AbFL and the manifestation of a cyst, it was found a possible relation of these elements for *L. interrogans* ($p = 0.000^*$) and *Brucella* sp. ($p = 0,004^{**}$). However, there was no relation between the presence of AbFL for *Neospora caninum*, BVDV and IBRV and the presence of cysts ($p > 0.05$). With respect to the PCR results, only 4 samples for *Brucella abortus* and 14 samples for the IBRV were positive. According to the results of the present study, it is concluded that *Brucella* sp., *Leptospira interrogans*, *Neospora caninum*, BVDV and IBRV, are not related directly to the generation of follicular cysts.

Keywords: Follicular cysts, cows, infectious diseases.

INTRODUCCIÓN

Existen enfermedades infecciosas que afectan la reproducción en las vacas lecheras como son la neosporosis, brucelosis, leptospirosis, rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB) y diarrea viral bovina (DVB) entre otras. Estas enfermedades pueden ser causa directa o indirecta de la pérdida de gestación en esta especie animal. Un proceso que afecta

directamente la fertilidad de las vacas lecheras, es la presencia de quistes ováricos causados por factores hormonales. En la actualidad no existen informes que indiquen una asociación entre la presencia de estos quistes y agentes infecciosos. Sin embargo, esta posibilidad no debe ser descartada, pues se sabe que la infección aguda por el virus de diarrea viral bovina (VDVB) es capaz de alterar la función ovárica reduciendo la fertilidad ya que el virus genera ooforitis y necrosis de células de la granulosa y de ovocitos (Grooms *et al.*, 1998; McGowan *et al.*, 2003).

Por otro lado, Anderson y col. (1976) identificaron anticuerpos de las clases IgG₁, IgG₂, IgM e IgA en el líquido de folículos ováricos sanos y quísticos y en los folículos quísticos, las concentraciones de IgG e IgM fueron más altas que las presentes en suero de los mismos animales. Este hallazgo sugiere que algunos agentes infecciosos, pueden estar presentes en los ovarios generando una respuesta inmune humoral y contribuir al desarrollo de quistes foliculares persistentes.

En otro estudio realizado por Whitmore y Archbald (1977), determinaron y cuantificaron inmunoglobulinas presentes en suero, líquido folicular, y secreciones vaginales y uterinas contra DVB y RIB. Los resultados mostraron que la IgG es la inmunoglobulina más importante encontrada en el suero y el líquido folicular. En el suero, la IgG siempre se encontró en una cantidad similar o mayor que en el líquido folicular. De igual forma la IgM estuvo presente en el suero, pero no siempre fue detectada en el líquido folicular. Los quistes ováricos foliculares se definen como estructuras llenas de un líquido acuoso o de un material semi-acuoso que en el caso de los bovinos, tienen un diámetro mayor a 2.5 cm y que persisten en el ovario por más de 10 días en ausencia de tejido lúteo. Se han asociado a deficiencia de la hormona luteinizante (LH) (Cook *et al.*, 1990; Hamilton *et al.* 1995; Vanholder *et al.*, 2006).

Las vacas con este tipo de quistes presentan anestro o celos intensos y prolongados. Actualmente no existen informes que describan la posibilidad de que además de los factores hormonales predisponentes en la generación de quistes ováricos en vacas lecheras, existan enfermedades infecciosas que puedan estar involucradas en la presencia de estos quistes, por lo que el objetivo del presente trabajo fue Identificar la asociación de quistes foliculares ováricos con la presencia de anticuerpos y antígenos de enfermedades reproductivas infecciosas en bovinos productores de leche

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental. La toma de muestras se llevó a cabo en el rastro Municipal de la ciudad de Torreón Coahuila y en algunos establos de la comarca lagunera, ubicados en la parte Noroeste de México. Se seleccionaron 116 bovinos

hembras de raza Holstein en edad reproductiva y se formaron cuatro grupos de animales. El grupo 1 se conformo por 35 vacas de una unidad de producción lechera clínicamente sanas (UPS) con más de dos partos. El grupo 2 fue conformado por 28 vacas de una unidad de producción lechera que se les detectaron quistes foliculares (QF) (> a 2 cm de diámetro) (UPOQ). El grupo 3 se conformó por 30 vacas utilizadas como grupo testigo que fueron enviadas al rastro sin la presencia de QF (ROS) y el grupo 4 fue constituido por 23 vacas enviadas al rastro a las cuales se les detectaron (QF) (ROQ) (Cuadro 1).

Toma de muestras. Se tomaron muestras sanguíneas sin anticoagulante de cada uno de los animales por grupo, por punción de la vena coccígea. Las muestras fueron centrifugadas para obtener los sueros, los cuales fueron almacenados en tubos Eppendorf y congelados a -20°C hasta su procesamiento. Además se obtuvieron muestras de líquido folicular de los animales con y sin quistes utilizando una jeringa estéril de 10 ml, se midió el volumen del mismo para ser colocado en un tubo de ensaye estéril y se almacenaron en refrigeración. Adicionalmente se recolectaron los ovarios quísticos (quistes > 2.5 cm de diámetro) de los animales enviados a rastro para su evaluación histológica. Estos se fijaron en formalina al 10%, y se trasportaron para su procesamiento en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Cuadro 1. Diseño de los grupos analizados

Características de los animales	Ud. de producción sanas (UPS)	Ud. de producción con OQ (UPOQ)	Rastro con OS (ROS)	Rastro con OQ (ROQ)
No. Animales	n = 35	n =28	n =30	n = 23
Muestras obtenidas	Suero	Suero/LF	Suero/LF/ Tejido	Suero/LF/ Tejido
Variables analizadas	Anticuerpos en suero (AcS)	en	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anticuerpos en suero (AcS). ▪ Anticuerpos en líquido folicular (AcLF). ▪ Antígeno en líquido folicular (AgLF). 	

OQ= ovario quístico, OS= ovario sano, LF

Pruebas serológicas. Las muestras de suero y líquido folicular (LF) de las vacas de cada grupo se sometieron a la detección de anticuerpos para las siguientes enfermedades: para *Leptospira interrogans*, se efectuó la técnica de aglutinación

microscópica (AM) contra un panel de diferentes serovariedades de leptosiras. En el caso de *Brucella* sp., se utilizó la prueba de rosa de bengala (RB) y la prueba de rivanol y en el caso de la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum*, anti-VDVB y anti-VRIB, se empleó el ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) utilizando juegos de reactivos comerciales. Dichas pruebas se llevaron a cabo en el INIFAP-CENID de Microbiología Animal en colaboración con el Departamento de Patología de la FMVZ, UNAM.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta prueba fue aplicada al líquido obtenido de los quistes y folículos ováricos para la detección de *Leptospira interrogans*, *Brucella abortus*, *Neospora caninum*, VDBV y el VRIB. Para la obtención de DNA y RNA se utilizaron juegos de reactivos comerciales.

PCR para *L. interrogans*. Se utilizaron los iniciadores LipL32-270F (5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT -3') y LipL32-692R (5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3'), que amplifica a un fragmento de 423 pares de bases. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: Buffer 1x, MgCl₂ (2 mM), dNTP's (200 µM c/u), 20 pmol de cada iniciador y Taq DNA polimerasa 1.25 U. La PCR inicia con un ciclo de 94°C durante 3 minutos de desnaturalización y 40 ciclos de 94°C a 1 minuto, 58°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 7 minutos (Levett *et al.*, 2005).

PCR para *Brucella abortus*. Se emplearon los iniciadores B4 (5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3') y B5 (5'-CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG-3) que reconocen una región interna de la secuencia del gen BCSP31, amplificando un fragmento de 223 pb. Las condiciones fueron las siguientes: Buffer 1x, MgCl₂ (1.5 mM), dNTP's (100 µM c/u), 20 pmol de cada iniciador y Taq DNA polimerasa 1.25 U, muestra 2.0 µl. La PCR inicia con un ciclo de desnaturalización de 95°C por 5 minutos y 35 ciclos de 95°C por minuto, 58°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 7 minutos (Mosquera *et al.*, 2008).

PCR para *Neospora caninum*. Con base en el espaciador interno transcrito 1 (ITS1) del DNA ribosomal de *Neospora caninum*, se utilizaron los iniciadores pN1 (5'-CTCCTTCGGAGAGGGGTA-3') y pN2 (5'-TCTTCCCTCAA CGCTAT C -3'), que amplifican un fragmento de 279 pares de bases. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: 5 µl de DNA, Buffer 1x, dNTP's mix (0.2 µM), MgCl₂ (2mM), Taq DNA polimerasa (5U). La PCR inicia con un ciclo de desnaturalización de 95°C por minuto y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 56°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 10 minutos (Sánchez *et al.*, 2006).

PCR para VDVB. Se utilizaron los iniciadores B145F (5'-AACAGTGGTGAGTTCGTTGGAT-3') y B314R (5'-CACCTATCAGGCTGTATTCGT-3'), que amplifican a un fragmento de 191 pares de bases. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: Buffer 1x, MgCl₂ (2.5 mM), dNTP's (100 µM c/u), 5 pmol de cada iniciador, Inh RNAsa 6 U, Taq DNA polmerasa 0.75 U y MULV 12 U, muestra 1.0 µl. La PCR inicia con un ciclo de 48°C durante 30 minutos y un ciclo de desnaturalización de 95°C por 10 minutos y 35 ciclos de 94°C minutos, 58°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 7 minutos (Sandvik *et al.*, 1997).

PCR para VRIB. Se emplearon iniciadores BOHV-F (5'-GCGGGCCTGGTTGCGTACTAC-3') y BOHV-R (5'-AGCAGATCTTCCGCGTTGATC-3') los cuales amplifican un fragmento de 202 pares de bases. Las condiciones fueron las siguientes Buffer 1x, MgCl₂ (1.5 mM), dNTP's (100 µM c/u), 20 pmol de cada iniciador y Taq DNA polmerasa 1.25 U, muestra 2.0 µl. La PCR inicia con un ciclo de desnaturalización de 95°C por 5 minutos y 35 ciclos de 95°C por minuto, 58°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 7 minutos (Medina *et al.*, 2009).

Histopatología. Con el fin de corroborar la presencia de quistes foliculares y descartar otro tipo de quistes ováricos, además de identificar otras lesiones, los ovarios quísticos previamente fijados en formalina al 10% fueron procesados por la técnica histológica de rutina, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 3 µm de grosor, fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E) y se observaron con un microscopio óptico.

Análisis de los datos. Los resultados de las observaciones, se analizaron mediante estadística descriptiva. Para determinar si la presencia de anticuerpos en suero y LF de los animales sujetos a estudio difería con la presencia de los microorganismos detectados de acuerdo al grupo de animales, se emplearon pruebas no paramétricas (Suma de posiciones de Wilcoxon/U Mann-Whitney con un grado de significancia de 0.05).

RESULTADOS

Pruebas Serológicas. En el cuadro 2, se resume el número de animales y el porcentaje de animales positivos en suero y LF de acuerdo al grupo.

Estadísticamente se determinó que no existen diferencias entre los grupos de animales analizados para cada una de las enfermedades $p > 0.05$ con respecto a la presencia de AcS, sin embargo, si se encontró diferencia estadística del grupo 3 (ROS) con el resto

de los grupos con respecto a la presencia de AcLF para *L. interrogans* ($p= 0.002$) y *Brucella* sp. ($p= 0.006$).

Cuadro 2. Vacas positivas a las pruebas serológicas de acuerdo al grupo

Grupo	G1 (UPS)		G2 (UPOQ)		G3 (ROS)		G4 (ROQ)		Total n / %	
	AcS	AcLF	AcS	AcLF	AcS	AcLF	AcS	AcLF	AcS	AcLF
<i>L. interrogans</i>	26	--	18	23	22	12	18	16	84/72.4	51/62.9
<i>Brucella</i> sp.	7	--	6	7	11	20	5	9	29/ 25.0	36/44.4
<i>N. caninum</i>	11	--	12	4	6	6	2	3	31/26.7	13/16.0
VDVB	29	--	26	14	23	11	19	4	97/83.6	29/35.8
VRIB	33	--	26	25	28	28	21	19	108/93	72/88.8

G1. UPS= Vacas de unidad de producción sanas. AcS = anticuerpos en suero. G2. UPOQ=Vacas de unidad de producción con ovarios quísticos. AcLF= anticuerpos en líquido folicular. G3. ROS= Vacas de rastro con ovarios sanos. G4.ROQ= Vacas de rastro con ovarios quísticos. (n/%)= Número de vacas positivas / Porcentaje de vacas positivas)

Además en los cuatro grupos de animales se determinó estadísticamente que existe diferencia entre los animales que presentan AcS con respecto a los que presentan AcLF para *Brucella* sp. ($p= 0.003$) y VDVB ($p= 0.000$), mientras que para *L. interrogans*, *Neospora caninum* y VRIB no se encontró diferencia estadística ($p>0.05$). En relación con los animales que presentaron AcS y la manifestación de un QF, estadísticamente se encontró que son independientes para las diversas enfermedades ($p>0.05$).

Mientras que para los animales que presentan AcLF y la manifestación de un quiste, se halló una posible relación de estos elementos para *L. interrogans* ($p= 0.000^*$) y *Brucella* sp. ($p= 0.004^{**}$). Sin embargo, la presencia de AcLF para *Neospora caninum*, VDVB y VRIB no se encontraron relacionados con la presencia de quistes $p>0.05$.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Solamente se hallaron 4 muestras positivas para *Brucella abortus* y 14 muestras positivas para el VRIB como se muestra en el (Cuadro 3).

Histopatología. De 29 muestras de ovarios quísticos, en 6 casos se identificaron quistes de inclusión mesotelial por lo que se excluyeron del estudio. El resto de las muestras (23) no presentaron ninguna otra lesión además de los QF.

Cuadro 3. Resultados de PCR para las enfermedades reproductivas en líquido folicular

Grupo	G2 (UPOQ)		G3 (ROS)		G4 (ROQ)		Total	
	n=28		n=23		n=30		n	
	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>L. interrogans</i>	28	0	23	0	30	0	81	0
<i>B.abortus</i>	28	0	21	2	28	2	77	4
<i>N. caninum</i>	28	0	23	0	30	0	81	0
VDVB	28	0	23	0	30	0	81	0
VIBR	26	2	19	4	22	8	67	14

G2. UPOQ=Vacas de unidad de producción con ovarios quísticos. G3. ROS= Vacas de rastro con ovarios sanos. G4.ROQ= Vacas de rastro con ovarios quísticos. (- / +)= Negativos/Positivos

DISCUSIÓN

Aunque en estudios anteriores se ha determinado la presencia de inmunoglobulinas contra el VRIB y el VDVB en suero y LF (Anderson *et al.*, 1976; Whitmore y Archbald, 1977); además de la detección antigénica del VDVB en estructuras del ovario (Grooms *et al.*, 1998; McGowan *et al.*, 2003), hasta el momento no se ha logrado establecer si las enfermedades infecciosas reproductivas se asocian al desarrollo de quistes foliculares. Al respecto los resultados del presente estudio indicaron que la presencia de anticuerpos y/o antígenos que se detectaron para las enfermedades reproductivas en suero y LF en los diferentes grupos de animales, no tuvieron asociación con la presencia de QF.

Con respecto a *L. interrogans*, al comparar la presencia de AcS con respecto a los AcLF, no se encontró diferencia estadística significativa, sin embargo, a pesar de esto, se halló que las vacas que presentan un QF tienen una mayor frecuencia de anticuerpos anti- *L. interrogans*. A pesar de los hallazgos serológicos, en la prueba de PCR no se encontró material genético en LF para *L. interrogans* en ninguno de los grupos, lo que indica que este agente no está asociado a la presencia de QF.

En el caso de *Brucella* sp., al igual que en el caso de *L. interrogans*, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en relación con el porcentaje de vacas que manifestaron AcS, observando que el porcentaje de vacas positivas fue menor (25%) comparado con el resto de las enfermedades reproductivas analizadas. Por otro lado, en LF se tuvo una frecuencia de 44.4% de vacas con anticuerpos anti-*Brucella* sp., además de encontrar diferencia estadística significativa entre los grupos, siendo G3 (ROS), el grupo que presentó un mayor porcentaje de animales positivos llamando la

atención que en los grupos donde se esperaba que tuvieran un mayor porcentaje de anticuerpos no los presentaron.

De acuerdo a lo anterior, se asume que los AcLF anti-*Brucella* sp. no están relacionados con QF. La diferencia estadística observada entre los AcS y AcLF, siendo mayor la frecuencia de AcLF, puede estar influenciada por la clase de inmunoglobulinas presentes en el folículo como se marca en estudios atrás, en dónde en los folículos quísticos las concentraciones de IgM e IgG han sido más altas que las presentes en suero. No se encontró ninguna relación en cuanto a las vacas que tienen AcS anti-*Brucella* sp y manifiestan QF, pero si se encontró asociación entre AcLF y la presencia de QF, aunado a esto, el hecho de hallar material genético de *Brucella abortus* por PCR en 4 vacas, dos pertenecientes al G3 (ROS) y 2 al G4 (ROQ), sugiere que es posible encontrar a *Brucella* en el ovario. Aunque los animales de todos los grupos presentaron anticuerpos anti-*Brucella* sp., tanto en suero (AcS) como en líquido folicular (AcLF), los animales con ovarios sanos tuvieron una mayor frecuencia de AcLF para *Brucella* sp, además de que los AcS y AcLF fueron diferentes y las vacas que presentaron QF mostraron una menor frecuencia de anticuerpos contra esta enfermedad, por lo que se determinó que *Brucella* sp no es un agente asociado a QF.

En el caso de *Neospora caninum*, se encontró que el 26.7% del total de animales presentaron AcS y al igual que en las enfermedades anteriores, tampoco hubo una diferencia estadística en la presencia AcS entre los grupos. La frecuencia de anticuerpos en todos los grupos en cuanto a AcLF fue de un 16.0% y no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Adicionalmente, no se observaron diferencias entre los AcS y AcLF, ninguna asociación entre los AcS y AcLF en relación con la presencia de QF, ni se halló material genético. Estos resultados indican contundentemente que no existe ninguna vinculación de *Neospora caninum* con el desarrollo de QF.

Para el caso del VDVB, el 83.6% de todas las vacas presentaron AcS. La frecuencia de AcLF fue de 35.8%, siendo menor que el porcentaje obtenido en suero (83.6%). No se hallaron diferencias estadísticas entre los grupos que tenían anticuerpos en ambas variables (AcS y AcLF), pero si hubo diferencias al comparar los AcS y AcLF para VDVB, resaltando que los AcS fueron más altos que los presentes en LF. Por otro lado, no se encontró asociación entre la presencia de AcS y AcLF en relación con QF, así como tampoco se encontró asociación, ni evidencia del microorganismo en el LF.

Sin embargo, se esperaba encontrar antígeno viral; pues se sabe que la infección aguda por el VDVB es capaz de alterar la función ovárica reduciendo la fertilidad y es posible detectar el antígeno viral en diversas estructuras y células del ovario (Grooms et

al., 1998; McGowan *et al.*, 2003). Posiblemente el no encontrar material genético del VDVB se deba, a que su presencia sea característica exclusiva de bovinos persistentemente infectados (PI). De acuerdo a los resultados, se concluye que el VDVB no se encuentra relacionado directamente con la presencia de QF.

Con respecto a el VRIB, se estimó un 93.0% de vacas con AcS, sin mostrar diferencias estadísticas entre los grupos. Por otro lado, el 88.8 % de animales presentaron AcLF y tampoco se encontró diferencia estadística con respecto a los AcLF por grupo.

Tampoco se encontró asociación entre la presencia de AcS y AcLF para VRIB y la manifestación de QF. Adicionalmente aunque si se encontró material genético en el LF para el VRIB en 14 vacas de los diferentes grupos que conformaron el estudio, de acuerdo a los resultados obtenidos, no se puede asegurar que el VRIB se asocie a QF.

CONCLUSIÓN

Brucella sp., Leptospira interrogans, Neospora caninum, VDVB y VIBR, no se encuentran relacionadas directamente con la generación de quistes foliculares. No obstante los hallazgos encontrados han generado un replanteamiento acerca de un posible efecto indirecto de las algunas enfermedades reproductivas en la generación de estos quistes.

LITERATURA CITADA

- ANDERSON M, Kroll J, Byskov G, Faber M. 1976. Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. J Reprod Fert 48: 109-118.
- COOK DL, Smith CA, Parfet JR, Youngquist RS, Brown EM, Garverick HA. 1990. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cows. J Reprod Fertil 89:155-66.
- GROOMS DL, Brock KV, Ward LA. 1998. Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. J Vet Diag Invest 10: 125-129.
- HAMILTON SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS, Salfen BE. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. Biol Reprod 53: 890-898.
- LEVETT PL, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol 54: 45-49.
- McGOWAN MR, Kafi M, Kirkland PD, Kelly R, Bielefeldt OH, Occhio MD, Jillella D. 2003. Studies of the pathogenesis of bovine Pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. Theriogenology 59: 1051-1066.

- MEDINA MR, Sánchez MA, Díaz de Arce Landa H, Valle MB. 2009. Development and evaluation of a polimerasa chain reaction assay to detect *Bovine herpesvirus 1*. Span. J Agric Res 7: 59-66.
- MOSQUERA XC, Bernal CV, Muskus CL, Berdugo JG. 2008. Detección de *Brucella abortus* por PCR en muestras de sangre y leche de vacunos. Rev.MVZ Córdoba 13: 1504-1513.
- SÁNCHEZ GF, Banda RV, Sahagun RA, Ledesma MN, Morales S.E. 2009. Comparison between immunohistochemistry and two PCR methods for detection of *Neospora caninum* in formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue of bovine fetuses. Vet Parasitol 164: 328-332.
- SANDVIK T, Paton DJ, Lowings PJ. 1997. Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5' untranslated cDNA regions. J Virol Methods 64: 43-56.
- VANHOLDER T, Opsomer G, Kruif A. 2006. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. Reprod Nutr Dev 46:105-119.
- WHITMORE H L, Archbald L F. 1977. Demonstration and quantitation of immunoglobulins in bovine serum, follicular fluid, and uterine and vaginal secretions with reference to bovine viral diarrhea and infectious bovine rhinotracheitis. Am J Vet Res 38: 455-457.